



# Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses

Florence Boyer

## ► To cite this version:

Florence Boyer. Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2016. Français. NNT : 2016LARE0003 . tel-01379536

**HAL Id: tel-01379536**

**<https://theses.hal.science/tel-01379536>**

Submitted on 11 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## **Université de La Réunion**

**Thèse Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de la Réunion**

**Spécialité : Biochimie**

**Présentée par : Florence Boyer**

# **Stress oxydant et pathologie diabétique**

## **Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses**

**Soutenue publiquement le 29 avril 2016**

### **Composition du Jury**

Pr Theeshan Bahorun	Professeur, Université de Maurice	Rapporteur
Dr.-HDR Olivier Joubert	Maitre de conférences, Université de Lorraine	Rapporteur
Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt	Professeur, Université de La Réunion	Examineur
Pr. Faadiel Essop	Professeur, Université de Stellenbosch	Examineur
Dr. Marjolaine Roche	Maitre de conférences, Université de La Réunion	Examinatrice
Pr. Emmanuel Bourdon	Professeur, Université de La Réunion	Directeur



# Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) dirigé par le **Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt** puis de l'unité mixte de recherche Diabète athérombose Thérapie Océan Indien (UMR DÉTROI) INSERM U1188 dirigée par le **Dr. Olivier Meilhac**.

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du Conseil Régional de La Réunion et des fonds européens. Il a bénéficié d'une collaboration avec le « Cardio Metabolic Research Group », dirigé par le **Pr. Faadiel Essop**.

J'adresse mes remerciements aux **Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt, Dr. Olivier Meilhac, et Pr Faadiel Essop**, pour m'avoir accueillie au sein de vos équipes et permis d'y réaliser ce travail. Je vous exprime ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect

Je remercie mon directeur de thèse, le **Pr. Emmanuel Bourdon**. Manu, merci de m'avoir permis d'effectuer ces quatre années de thèse avec toi. Tes conseils, ton optimisme et ton calme m'ont permis de prendre confiance en moi et d'aller jusqu'au bout de cette aventure. J'espère pouvoir retravailler avec toi un jour.

Au **Pr. Faadiel Essop**, merci pour ton accueil au sein de ton unité de recherche et ton laboratoire. Ta gentillesse et ton professionnalisme m'ont aidé tout au long de mon séjour en Afrique du Sud. Je remercie toute l'équipe du CMRG pour leur accueil et leur aide à la réalisation de mes expériences dans le laboratoire. [*Pr. Essop, thank you for your hospitality in your unit and your laboratory. Your kindness and professionalism have helped me throughout my stay in South Africa. I thank the whole CMRG team for their hospitality and support in the realization of my work in the laboratory*].

Je remercie aussi les personnalités scientifiques qui ont accepté de juger mon travail : le **Pr. Theeshan Bahorun** (Université de Maurice), le **Dr. Olivier Joubert** (Université de Lorraine), le **Pr. Faadiel Essop** (Université de Stellenbosch), le **Dr. Marjolaine Roche** (Université de La



Réunion) et le **Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt** (Université de La Réunion). Je les remercie pour le temps consacré à évaluer ce travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier les **Drs. Nicolas Diotel** et **Philippe Rondeau** pour leur aide à la réalisation de certains tests. Je les remercie pour le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer et pour tous les conseils qu'ils m'ont donnés.

Je remercie aussi ceux qui ont participé à la relecture de mon manuscrit, en particulier le **Dr Christine Robert Da-Silva**, le **Dr. Nicolas Diotel** et le **Dr. Olivier Meilhac**. Merci pour le temps passé à lire ce manuscrit et pour tous vos précieux conseils.

Je remercie **tous les membres de DÉTROIT**, qu'ils soient enseignants, thésards, ingénieurs ou techniciens tout particulièrement Aurélie, Latufa, Angélique, Jessica mais aussi ma petite binôme de thèse qui a fini avant moi, Jennifer. Merci pour tous les bons moments passés ensemble qui m'ont fait garder le sourire même en période de stress intense.

Je remercie aussi les membres des autres unités de recherche et tous les membres du CYROI pour tous les bons moments de convivialité passés ensemble.

Enfin, je remercie tous mes proches, amis et familles (de La Réunion, de la Métropole et de l'Afrique du Sud), pour leur soutien et leur aide. Merci tout particulièrement à ceux qui m'ont nourri en temps de crise.

# Table des matières

Remerciements .....	3
Table des matières.....	5
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux .....	11
Liste des annexes.....	11
Liste des abréviations .....	12
I. Introduction .....	15
II. Rappels Bibliographiques.....	17
II.1. Le diabète .....	18
II.1.1 Définition et les principaux types de diabète.....	18
Définition.....	18
Le diabète de type 1.....	18
Le diabète de type 2.....	19
Le diabète gestationnel .....	21
II.1.2 Prévalence du diabète dans le monde .....	21
II.2 Le stress oxydant .....	23
II.2.1 Définition .....	23
II.2.2 Les principaux Radicaux libres.....	24
L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ .....	24
Le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ .....	24
Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ .....	24
II.2.3 Formation des dérivés actifs de l'oxygène .....	25
Les sources endogènes.....	25

Les sources exogènes .....	27
II.2.4 Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène.....	28
Les protéines .....	28
Les lipides .....	29
L'ADN .....	30
II.2.5 Les systèmes antioxydants.....	31
Les antioxydants enzymatiques.....	31
Les antioxydants non enzymatiques .....	33
II.3 Le Protéasome : une machinerie cellulaire qui dégrade les protéines.....	34
II.4 Toxicité du glucose.....	36
II.4.1 Voie des polyols.....	37
II.4.2 Voie de la protéine kinase C.....	38
II.4.3 Voie des hexosamines .....	39
II.4.4 Formation des produits avancés de glycation (AGE). ....	40
La glycoxydation ou auto-oxydation du glucose.....	41
La glycation.....	42
Les récepteurs des AGE .....	43
II.5 L'Albumine glyquée : un modèle de stress oxydant.....	46
II.6 Les souris db/db : un modèle de diabète de type 2 .....	48
II.6.1 Caractéristiques du modèle .....	48
II.6.2 Différences entre le modèle db/db et les personnes atteintes de diabète de type 2 .....	49
II.7 Le tissu adipeux et le tissu cardiaque : cibles du stress oxydant .....	51
II.7.1 L'obésité : facteur d'apparition du diabète de type 2.....	51
II.7.2 Stress oxydant et tissus adipeux .....	52
II.7.3 Stress oxydant et complications cardiovasculaires chez les diabétiques.....	55

III. Objectifs du travail.....	57
IV. Matériels et méthodes.....	61
V. Résultats .....	75
Etude 1 : Impact du stress oxydant induit par une hyperglycémie chronique ou intermittente sur un modèle de cellules adipocytaires, les SW872.....	77
Introduction.....	77
Article: "Hyperglycemia induces oxidative damages in SW872" ( <i>Boyer et al. 2014</i> ).....	79
Discussion .....	94
Etude 2 : Altération des activités du protéasome au niveau du foie de souris db/db ..	96
Introduction.....	96
Article: "Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin" ( <i>Patche et al.</i> ) En cours de soumission .....	98
Discussion .....	100
Etude 3 : Stress oxydant et tissus adipeux .....	104
Introduction.....	104
Review : "Oxidative Stress and adipocytes biology: Focus on the role of AGEs" ( <i>Boyer et al. 2015</i> ).....	Erreur ! Signet non défini.
Article: "Enhanced oxidative stress in adipose tissue from diabetic mice, possible contribution of glycated albumin" ( <i>Boyer et al.</i> ) En cours de soumission.....	116
Discussion .....	140
Etude 4 : Impact du stress oxydant induit par l'hyperglycémie et l'albumine glyquée au niveau cardiaque .....	146
Introduction.....	146
Article: "Glycation abolishes the cardioprotective effects of albumin during ischemia-reperfusion" ( <i>Mapanga et al.</i> ) En cours de soumission .....	148
Discussion .....	180
VI. Conclusion et perspectives.....	184

<b>Annexes .....</b>	<b>188</b>
<b>Annexe 1 Autre article issu de mon travail « Cardio-Metabolic effects of HIV protease inhibitors (Lopinavir/Ritonavir) » (<i>Kathleen M.S.E et al. 2013</i>) .....</b>	<b>190</b>
<b>Annexe 2 : Séquence des amorces pour qPCR.....</b>	<b>204</b>
<b>Annexe 3 : Expression de gènes d'enzymes anti-oxydantes du TAE de souris db/db.</b>	<b>205</b>
<b>Annexe 4 : Expression de RAGE du TAE de souris db/db .....</b>	<b>206</b>
<b>Références .....</b>	<b>208</b>

# Liste des figures

Figure 1. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1 .....	19
Figure 2. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2 .....	20
Figure 3. Prévalence du diabète dans le monde en 2014 .....	22
Figure 4. Le stress oxydant .....	23
Figure 5. Détection des protéines carbonylées. ....	29
Figure 6. Structure et activité du protéasome.....	35
Figure 7. Voies activées par l'hyperglycémie. ....	37
Figure 8. Voie des polyols.....	38
Figure 9. Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique.....	39
Figure 10. Voie des hexosamines.....	40
Figure 11. Formation des AGE par la glycoxydation.....	42
Figure 12. Formation des AGE par la glycation.....	43
Figure 13. Les différents récepteurs des AGE .....	44
Figure 14. Progression des caractéristiques des souris db/db au cours du temps .....	49
Figure 15. Classification en fonction de l'IMC. ....	51
Figure 16. Physiopathologie adipocytaire. ....	54
Figure 17. Mesure de la glycémie chez les rats traités à la streptozotocine.....	95
Figure 18. Mesure des activités du protéasome du foie de souris db/+ vs db/db. ....	101
Figure 19. Mesure du taux de carbonyl par ELISA du foie de souris db/db. ....	101
Figure 20. Activité de type chymotrypsine du protéasome des cellules 3T3L1. ....	141
Figure 21. Taux de protéines carbonylées déterminé par ELISA du TAE de souris db/db..	141
Figure 22. Taux de protéines oxydées déterminé par ELISA des cellules 3T3L1. ....	142
Figure 23. Expression d'IL6 et TNF $\alpha$ par ELISA chez les souris db/db. ....	143
Figure 24. Expression d'IL6 des cellules 3T3L1.. ....	143
Figure 25. Mesure du taux de produit issu de la peroxydation lipidique du cœur de souris db/db.....	180

<b>Figure 26. Activité protéolytique du protéasome chez les souris db/db. ....</b>	<b>181</b>
<b>Figure 27. Production de ROS et activité NADPH oxydase.. ....</b>	<b>182</b>
<b>Figure 28. Analyse de l'expression de proteines par Western Blot.....</b>	<b>183</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques entre les souris db/db et les sujets diabétiques de type 2 .....	50
Tableau 2. Paramètres cliniques et métaboliques des souris db/+ et db/db à 12 semaines.....	100

## Liste des annexes

Annexe 1 Article issu de mon travail « Cardio-Metabolic effects of HIV protease inhibitors (Lopinavir/Ritonavir) » ( <i>Kathleen M.S.E et al. 2013</i> ) .....	190
Annexe 2. Séquence des amorces pour qPCR. ....	204
Annexe 3. Expression de gènes d'enzymes anti-oxydantes du TAE de souris db/db. ....	205
Annexe 4. Expression de RAGE du TAE de souris db/db.....	206



# Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGE : Advanced Glycated Endproduct (produits avancés de glycation)

AGER : Advanced Glycated Endproduct Receptor (récepteur aux produits avancés de glycation)

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin (sérum albumine bovine)

CD36: cluster of differentiation 36

CoA: coenzyme A

DAG: diacylglycérol

DCFH-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

DID: Diabète insulino-dépendant

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DNID: Diabète non-insulino-dépendant

DNP: 2,4-dinitrophénol

DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

DTNB: Acide 5-5'-dithiobis, 2-nitrobenzoïque

ECL: Enhanced chemiluminescence

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase

FITC: isothiocyanate de fluorescéine

GAPDH: Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFAT: Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase

GLUT4: Transporteur de glucose 4

GPx: Glutathion peroxydase

GSSG/GSH: Glutathion réduit/oxydé

HbA1C: Hémoglobine glyquée

HDL: High density lipoproteins (Lipoprotéines de haute densité)  
HMGB1: high-mobility group box 1  
HRP: Horse Radish Peroxydase  
4-HNE: 4-Hydroxynonenal  
IL6/1 : Interleukine 6/1  
IMC : Indice de masse corporelle  
INVS : Institut de veille sanitaire  
JNK: c-Jun N-terminal kinases  
LDL : Low density lipoproteins (Lipoprotéines de basse densité)  
LPS : lipopolysaccharide  
MCA : 4-methylcoumaryl -7-amide  
MDA : malondialdehyde  
MGO : Methylglyoxal  
NA : 2-naphtylamine  
NFkB: Nuclear factor-kappa B  
Nox: NADPH oxydase  
OGT: O-GlcNac transférase  
OGlcNac: O-linked N-acetyl glucosamine  
8-OH-dG: 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine  
PBS: Phosphate buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
PE: Phycoerythrin  
PKC: Protéine kinase C  
PI3-kinase: phosphoinositide 3-kinase  
RAGE: Récepteurs membranaires spécifiques des AGE  
RE: Réticulum endoplasmique  
ROS: Reactive oxygen species (Espèces réactives de l'oxygène)  
SDS : Sodium dodecyl sulfate  
SIRT1: NAD(+)-dependent protein deacetylase sirtuin 1  
SOD: Superoxyde dismutase  
SR-A/B: Scavenger receptor A/B  
SVF: Sérum de veau foetal

TBA: Thiobarbituric acid

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances

TCA: acide trichloroacétique

TFA: Acide trifluoroacétique

TMB: 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale

UTP: uridine triphosphate

UPS: ubiquitin proteasome system

# I. Introduction

Le diabète et les pathologies qui lui sont associées, sont devenus depuis ces dernières années un fléau mondial touchant plus de 380 millions de personnes (1). Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique et un stress oxydant important. Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre espèces pro-oxydantes et antioxydantes en faveur des premières. Le stress oxydant va participer au dysfonctionnement cellulaire et favoriser le développement de pathologies associées au diabète.

Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque de développer un diabète de type 2. L'obésité est caractérisée par un excédent de masse adipeuse qui est nuisible pour la santé. L'obésité s'accompagne d'un stress oxydant important ainsi que d'une inflammation chronique. Les cellules adipeuses constituent ainsi une cible privilégiée pour l'étude des effets du stress oxydant dans le cadre du diabète.

Les patients diabétiques ont un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité dans la population générale. Un des facteurs reliant diabète et maladie cardiovasculaire est le stress oxydant.

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique, source d'un stress oxydant accru et de dommages oxydatifs tissulaires. Notamment l'hyperglycémie favorise la glycation des protéines aboutissant à la formation de produits avancés de glycation (AGE). Bien que l'action délétère des AGE soit reconnue dans le diabète, leurs rôles au niveau cardiaque et adipeux restent encore assez méconnus.

Ce manuscrit est essentiellement focalisé sur l'étude des dommages de type oxydatif induits par l'hyperglycémie ou l'albumine glyquée, qui représente un modèle d'AGE, au niveau adipeux et cardiaque.

Ce manuscrit comporte trois grandes sections :

- La première section consiste en une **étude bibliographique** divisée en plusieurs parties. Cette partie fait un état des lieux des connaissances actuelles concernant le diabète, l'obésité, ainsi que le stress oxydant. Elle se terminera par la présentation des objectifs de travail.
- La deuxième section détaille l'ensemble des **matériels et méthodes** utilisés lors de ma thèse.
- La troisième et dernière section rassemble l'ensemble de mes **résultats** qui seront discutés et sera divisée en quatre études. La première étude porte sur l'impact du stress oxydant induit par l'hyperglycémie sur un modèle adipocytaire, les cellules SW872. La deuxième étude s'intéresse aux activités du protéasome au niveau du foie de souris db/db. La troisième étude concerne l'impact du stress oxydant induit par l'hyperglycémie et l'albumine glyquée, au niveau du tissu adipeux de souris db/db mais aussi des cellules adipeuses 3T3L1. Enfin, la dernière étude, se focalise sur l'impact du stress oxydant au niveau cardiaque. Trois modèles différents sont ainsi utilisés dans cette étude : des cœurs de rat isolés et reperfusés, des souris db/db et des cellules cardiaques H9C2 traitées dans des conditions d'hyperglycémie ou en présence d'albumine glyquée.

## **II. Rappels Bibliographiques**

## **II.1. Le diabète**

### **II.1.1 Définition et les principaux types de diabète**

#### **Définition**

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit (1–3). Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le dépistage du diabète est réalisé grâce à une prise de sang à jeun. On parle de diabète lorsque la concentration de glucose à jeun dans le sang veineux est supérieure à 1,26 g/l. Au cours de son évolution, le diabète peut engendrer de nombreuses complications touchant le cœur, les reins ou les yeux (2).

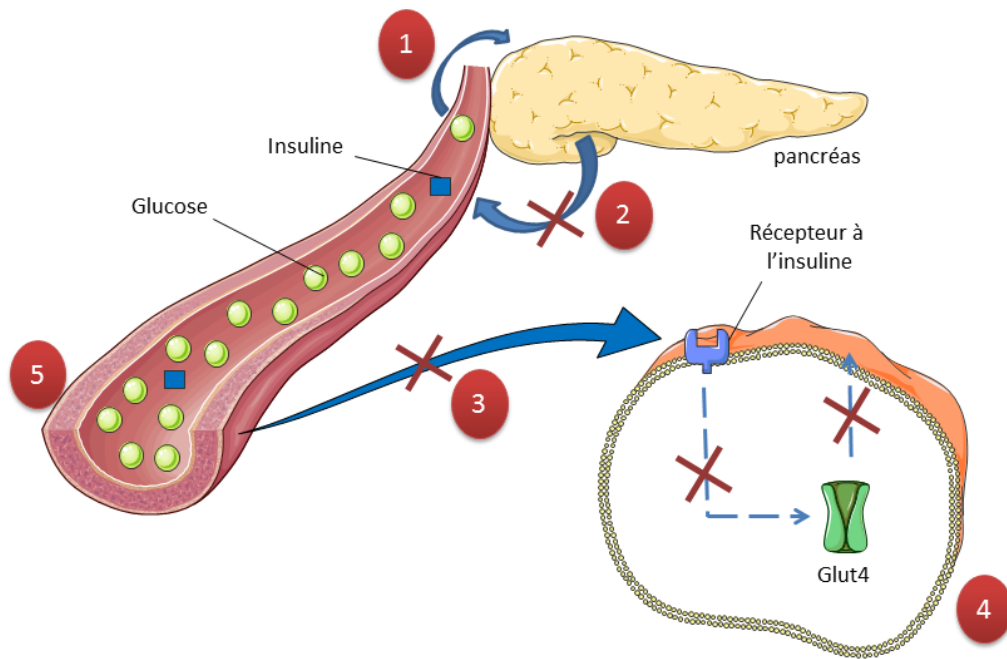
Il existe plusieurs types de diabète différents dont le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel.

#### **Le diabète de type 1**

Le diabète de type 1, anciennement connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID), est caractérisé par une absence ou une trop faible production d'insuline par les cellules du pancréas (**Figure 1**).

C'est une maladie qui apparaît le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence. Environ 65 000 enfants âgés de moins de quinze ans développent chaque année, dans le monde, un diabète de type 1 (4,5). C'est une maladie auto-immune au cours de laquelle les défenses de l'organisme, en particulier des anticorps produits par des lymphocytes, détruisent les cellules bêta du pancréas, d'où l'incapacité de l'individu atteint à sécréter de l'insuline (2,3).

Le diabète de type 1 représente environ 10% des cas de diabète en France et dans le monde. Le traitement du diabète de type 1 repose sur des injections d'insuline pour compenser le défaut de production de cette hormone par les cellules bêta pancréatique.



**Figure 1. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1** (adapté de (1, 6)). 1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline. 2) Les cellules  $\beta$  du pancréas ne produisent pas ou très peu d'insuline. 3) et 4) Défaut de transduction du signal induit par l'insuline et défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) ce qui conduit à un défaut de la captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

## Le diabète de type 2

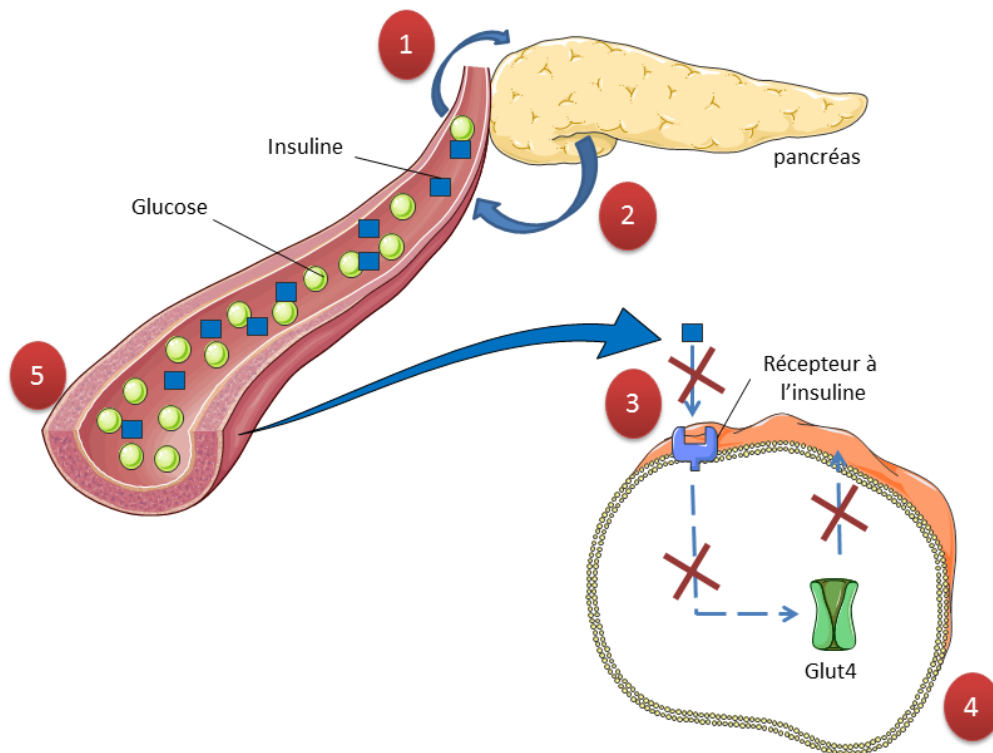
Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) est caractérisé par un défaut d'action de l'insuline (insulino-résistance) qui peut évoluer vers une insulino-pénie, c'est-à-dire une trop faible production d'insuline par le pancréas, dû à un épuisement des cellules sécrétrice d'insuline. Il en résulte une hyperglycémie chronique (**Figure 2**). C'est la forme la plus fréquente du diabète (90% des cas de diabète traités) (7).

Les causes du diabète du type 2 sont multiples. Il existe en effet plusieurs facteurs de risque responsables de l'apparition du diabète de type 2 : l'obésité, l'inactivité physique, une alimentation mal équilibrée mais aussi des antécédents familiaux. Environ 70% des



personnes atteintes de diabète de type 2 sont obèses et l'obésité elle-même peut causer ou aggraver l'insulino-résistance (8).

De nombreuses personnes atteintes de diabète de type 2 en sont longtemps inconscientes car plusieurs années peuvent s'écouler avant que les symptômes n'apparaissent ou soient reconnus (1).



**Figure 2. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2** (adapté de (1, 6)). 1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline. 2) Production d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. 3) et 4) L'insuline ne fonctionne pas correctement et on a une défaillance de la transduction du signal induit par l'insuline et un défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) ce qui conduit à une mauvaise captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

## **Le diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel est un diabète qui survient lors de la grossesse, généralement vers le 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre. Il est parfois révélateur d'un diabète préexistant. Ce trouble peut provenir de l'inhibition exercée par les hormones produites par le placenta, dont l'HPL, hormone lactogène placentaire, sur l'action de l'insuline et à l'origine d'une insulino-résistance.

Il concerne 1 à 4 % des grossesses et peut évoluer vers un diabète de type 2 (9).

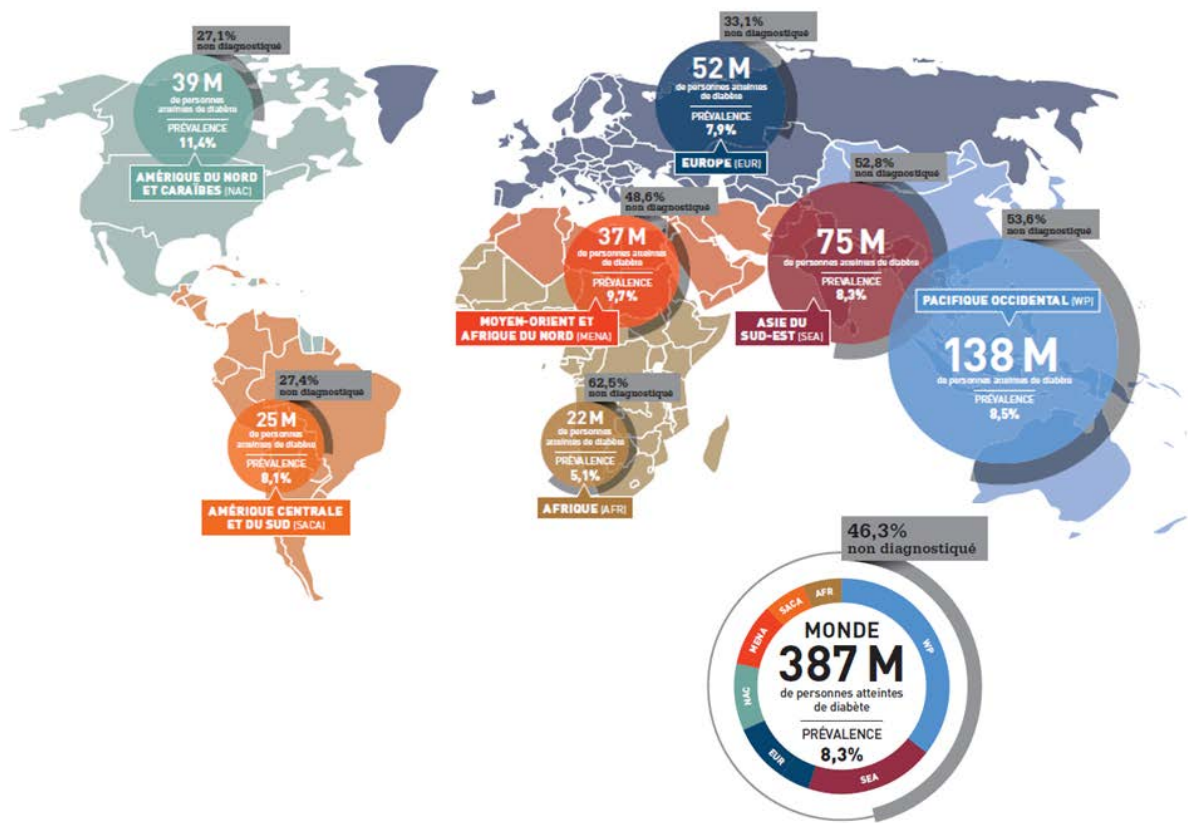
### **II.1.2 Prévalence du diabète dans le monde**

La prévalence du diabète dans le monde ne cesse d'augmenter depuis plusieurs années. En 2013, 382 millions de personnes ont été diagnostiquées diabétiques, en 2014, elle sont 387 millions (**figure 3**) et ce nombre devrait atteindre les 592 millions de personnes en 2035 (1). Ces chiffres pourraient être bien plus élevés, car on estime à près de 175 millions le nombre de personnes non diagnostiquées (1).

En France, en 2013, on estimait à 3 millions (soit environ 4,7 %) le nombre de personnes traitées pour le diabète. A la Réunion, la prévalence du diabète est trois à quatre fois plus élevée qu'en métropole (7).

L'Afrique du Sud est le deuxième pays du continent africain avec la prévalence la plus élevée pour le diabète. En 2013, sur le continent africain, on compte plus de 20 millions de personnes atteintes de diabète dont près de 2,6 millions de personnes en Afrique du Sud (1).

Du fait de l'augmentation constante de la prévalence du diabète dans le monde, cette maladie est aujourd'hui qualifiée de pandémie. Elle est dans les pays à revenus élevés, et selon le pays, la quatrième ou cinquième cause de décès (1).



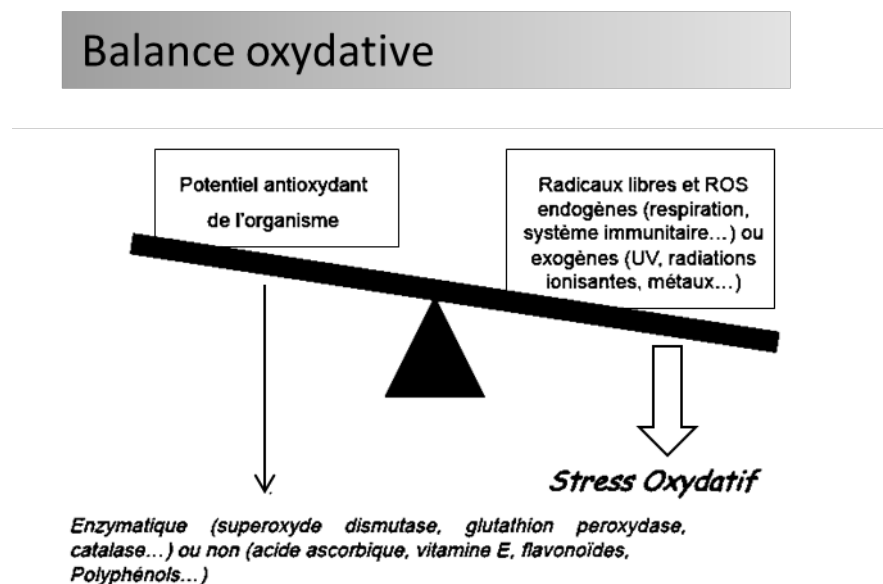
**Figure 3. Prévalence du diabète dans le monde en 2014** (source : International Diabetes Federation, 2014)

L'apparition de maladies métaboliques telles que le diabète mais aussi l'obésité serait principalement due à des changements de mode de vie. Ainsi, le manque d'activité physique mais aussi une alimentation trop riche en graisse ou en sucre seraient des facteurs de risque expliquant le développement accéléré de ces maladies. Un niveau socio-économique défavorable, ainsi que des facteurs de prédisposition (antécédents familiaux) sont à prendre en compte dans l'augmentation de la prévalence du diabète (10).

## II.2 Le stress oxydant

### II.2.1 Définition

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de radicaux libres est normale et ne constitue pas une situation pathologique en soi. En effet, elle jouerait un rôle dans certaines voies de signalisation, en activant notamment la voie NF- $\kappa$ B (11,12). De plus, il existe divers systèmes permettant d'éliminer les ROS et de rétablir la balance oxydative. Ces systèmes peuvent être des enzymes (SOD, catalase par exemple) ou de simples molécules (vitamine E par exemple).



**Figure 4.** Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre pro-oxydant et système antioxydant (13)

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre production de radicaux libres et espèces anti-oxydante en faveur de la production de radicaux libres ou espèces réactives oxygénées (**Figure 4**) (13).

## **II.2.2 Les principaux Radicaux libres**

### **L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$**

L'anion superoxyde est principalement produit par la mitochondrie à partir de l' $O_2$ . Il peut se dismuter spontanément ou être catalysé par des ions ferreux en peroxyde d'hydrogène. Il peut jouer un rôle dans les voies de signalisation (14,15). Cependant comme la vitesse de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde est lente et la demi-vie de l'anion superoxyde longue (> à quelques dizaine de seconde), l'anion superoxyde va pouvoir oxyder certains constituants cellulaires ou générer d'autres radicaux libres plus toxiques tel que le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). L'anion superoxyde peut aussi être éliminé grâce à la superoxyde dismutase (SOD).

### **Le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$**

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre, puisqu'il ne possède pas d'électron libre. Cependant, il fait partie des dérivés actifs de l'oxygène (16). Il est produit par la dismutation de l'anion superoxyde. Bien qu'il soit utilisé par l'organisme pour lutter contre les pathogènes et qu'il joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation, comme l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, il est aussi toxique pour les cellules du fait de sa capacité à générer d'autres ROS. Il a aussi la capacité à diffuser à travers les membranes cellulaires, ce qui lui permet d'étendre ses effets dans d'autres compartiments cellulaires (17). En présence de métaux, il est capable de générer le radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène peut oxyder directement les composés biologiques notamment les protéines, en particulier les résidus cystéines et ainsi former des ponts disulfures (18). Cela va entraîner une modification de la structure de la protéine et altérer sa fonction.

Le peroxyde d'hydrogène peut être dismuté en eau et dioxygène, réaction catalysée par la catalase.

### **Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$**

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferreux. C'est le radical le plus toxique et le plus réactif. Il peut oxyder tous les acides aminés mais est plus réactif avec les acides aminés soufrés et aromatiques (16,19). Il est en outre capable d'inhiber certaines enzymes. Le radical hydroxyle réagit aussi avec l'ADN, ce qui va altérer sa structure et entraîner des mutations, et participe aux réactions de peroxydation lipidique (20).

### **II.2.3 Formation des dérivés actifs de l'oxygène**

Ce déséquilibre entre espèces pro-oxydantes et antioxydantes peut avoir une origine exogène (rayonnement UV, toxines,...) ou endogène, dû à un dysfonctionnement des sources de production de ROS ou de leur système d'élimination.

#### **Les sources endogènes**

##### ***La mitochondrie***

La mitochondrie est le principal organite producteur d'énergie sous forme d'ATP. Elle est aussi considérée comme la plus grande source de production de ROS. La production physiologique de ROS par la mitochondrie est de l'ordre de 0,2 à 0,4 % de l'oxygène consommé (21,22). Il a été démontré que les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont responsables de la production d'anion superoxyde (23–25). L'anion superoxyde est ensuite rapidement converti en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase (SOD).

Si la mitochondrie est la source principale de la production des ROS, elle est aussi une des cibles des ROS. Ainsi, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) peut réagir avec de l'oxyde d'azote et former du peroxynitrite. Le peroxynitrite peut endommager les composants de la chaîne respiratoire mais aussi l'ADN mitochondrial, ce qui va augmenter la production de ROS (26). On va ainsi avoir une modification de la morphologie et de la fonction des mitochondries entraînant une génération de ROS plus importante.

Dans le cadre de la pathologie diabétique, une exacerbation de l'activité mitochondriale peut participer à l'installation d'un stress oxydant accru à l'origine d'une inhibition de la sécrétion d'insuline ou de la transduction de son signal contribuant ainsi à l'installation de l'insulino-résistance (27–29). En effet, l'excès de ROS produit par la mitochondrie peut inhiber la phosphorylation du récepteur de l'insuline pouvant conduire à une plus faible translocation du transporteur de glucose GLUT4 (30).

### ***Les NADPH oxydases***

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique membranaire. Les NADPH oxydases (Nox) ont d'abord été considérées comme des enzymes uniquement exprimées dans les cellules immunitaires (macrophages et monocytes). Il a ensuite été découvert qu'il existait 7 isoformes de NADPH oxydase exprimées dans divers tissus et impliquées dans divers processus biologiques (31). Les NADPH oxydases catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène ( $O_2$ ), ce qui produit du  $NADP^+$ , du  $H^+$  et de  $O_2^{\cdot-}$ . Ces deux derniers composés réagissent entre eux pour former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce complexe enzymatique entraîne ainsi la synthèse de ROS. L'activité de la NADPH est sensible à des facteurs métaboliques tels que l'hyperglycémie ou la présence d'AGE (31–34).

Au niveau cardiaque, il s'agit de la première source de production de ROS (35–37). Plus particulièrement, ce sont les isoformes Nox2 et Nox4 qui sont le plus impliquées dans la production de ROS au niveau des cardiomyocytes.

### ***Peroxisomes***

Le peroxysome est une source importante de  $H_2O_2$ . Il a d'abord été établi que la fonction du peroxysome était la dégradation de l' $H_2O_2$  via la catalase peroxysomale (38). Cependant, il semblerait que les peroxysomes soient impliqués dans plusieurs processus biologiques. Ils participent par exemple à la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

La présence d'un stress oxydant va entraîner une augmentation du nombre de peroxysome.

### ***La xanthine oxydase***

La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine ainsi que la xanthine en acide urique (39). Cette enzyme est surtout présente dans le foie mais peut se retrouver dans la circulation en cas d'atteinte hépatique. La production de ROS par la xanthine oxydase est faible en condition physiologique mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion. Dans le cas de l'ischémie, la grande consommation de l'ATP conduit à une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine et donc une production de ROS plus importante.

Au cours de la pathologie diabétique l'accumulation d'acide urique participe à la progression de la néphropathie diabétique. Il a été démontré que lorsque l'on bloque la xanthine oxydase grâce à des inhibiteurs, on observe une diminution de la concentration en acide urique et également une réduction des dommages liés au diabète (40).

### ***Le réticulum endoplasmique***

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques possèdent un réticulum endoplasmique (RE) très développé qui est responsable de la production d'insuline. Dans le cadre de la pathologie diabétique, on pourra avoir une production importante d'insuline par le RE (41,42). Or, lorsque le RE est soumis à une demande constante de production de protéines, comme dans des conditions d'hyperglycémie chronique, les protéines synthétisées pourront être mal repliées et/ou non fonctionnelles. L'accumulation de protéines mal repliées peut contribuer à l'installation d'un stress oxydant (42,43).

### **Les sources exogènes**

En plus des sources endogènes, il existe des sources exogènes liées le plus souvent à une mauvaise hygiène de vie. Parmi ces sources exogènes, on peut citer le tabagisme, l'alcool ou la consommation d'huiles oxydées ainsi que des agents physiques tels que les UV, la chaleur ou certains polluants (44).



De plus certains métaux tels que le cuivre ou le fer, lorsqu'ils sont apportés en excès peuvent générer des ROS (45).

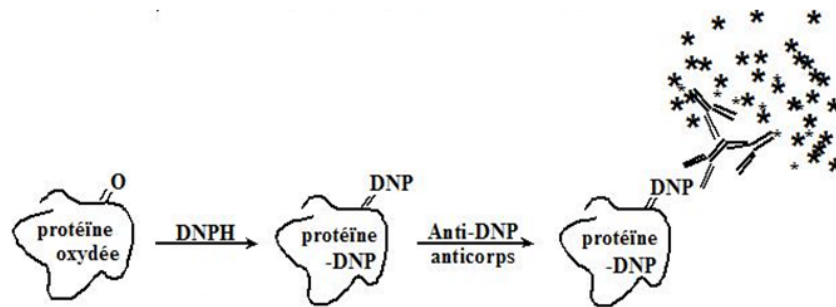
## **II.2.4 Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène**

### **Les protéines**

Tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ROS et former des groupements carbonylés. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) sont les plus sensibles à l'oxydation. Par exemple, l'oxydation des groupements thiols (-SH) peut donner lieu à la formation de pont disulfure entre deux résidus (46). Ces dommages peuvent entraîner des altérations structurales et fonctionnelles importantes : perte d'activité enzymatique, non reconnaissance de la protéine par son récepteur. Normalement, ces protéines non fonctionnelles sont prises en charge par des systèmes protéolytiques tel que le protéasome et dégradées. Cependant, lorsque ces systèmes protéolytiques sont défaillants, les protéines oxydées peuvent former des agrégats, dû au fait qu'elles deviennent hydrophobes et s'accumuler dans les cellules (12,47,48).

La diminution de groupements thiols ou la présence de protéines carbonylées, sont des marqueurs de l'oxydation de protéines, mesurables par différents tests biochimiques. La mesure des groupements thiols peut être réalisée grâce à la méthode d'Ellman. Le principe de ce test est basé sur le clivage du DTNB (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) pour donner du TNB (2-nitro-5-thiobenzoate) qui est un composé coloré mesurable par spectrophotométrie (49).

La détection des groupements carbonyles peut s'effectuer par des tests immunologiques (Western blot, ELISA) ou colorimétrique mis au point par le Docteur Rodney Levine. Les groupements carbonyles ne sont pas détectables directement. Cependant, les résidus carbonylés peuvent réagir avec de la DNPH (dinitrophénylhydrazine) et former des complexes protéines-DNP. Le groupement DNP est détectable au moyen d'anticorps spécifiques (**Figure 5**) (50–52).



**Figure 5. Détection des protéines carbonylées** (adaptée de (50–52)). Les groupements carbonyles (C=O) ne sont pas directement reconnaissables par des anticorps. Pour détecter ces groupements, une étape de dérivatisation est réalisée. Cette étape consiste à faire réagir la DNPH avec les groupements carbonyles des protéines pour former des protéines-DNP. Les groupements DNP peuvent alors être détectés par des anticorps anti-DNP.

## Les lipides

Les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée du radical hydroxyle et vont former un radical peroxy. Le radical peroxy, après évolution peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal (48).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipides membranaires ou les lipides circulants. En fonction du type de lipide concerné, les conséquences seront différentes.

L'oxydation des lipides circulants va aboutir à la formation de LDL oxydées qui seront captées par des macrophages. Les macrophages vont se transformer en cellules spumeuses, qui jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (53). De plus la présence de LDL oxydées va entraîner une production de cytokines pro-inflammatoire (54).

L'oxydation des lipides membranaire va entraîner une altération de la fluidité membranaire, de sa perméabilité mais aussi une perte d'activité des récepteurs (53,55).

La glutathion peroxydase mais aussi la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) sont connus pour participer à la détoxification des peroxydes lipidiques (56).

La présence de malondialdéhyde (MDA) ou de 4-hydroxynonanal (4-HNE) représente des marqueurs de l'oxydation lipidique détectable par des tests biochimiques ou immunologiques. Le test le plus connu pour mesurer le taux de MDA est le test TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances). A température élevée, le MDA va réagir avec l'acide thiobarbiturique et former un composé coloré rose-rouge mesurable par spectrophotométrie (57,58).

Le 4-HNE est le produit de peroxydation le plus étudié (59). Le 4-HNE joue un rôle important dans le développement du diabète comme molécule de signalisation et comme agent cytotoxique de la peroxydation lipidique (59,60). Les propriétés lipophiles du 4-HNE font qu'il reste associé le plus souvent aux membranes mais il peut aussi diffuser à l'intérieur de la cellule (61). La présence de 4-HNE peut être détectée grâce à des anticorps polyclonaux ou monoclonaux qui sont utilisés pour des techniques comme le test ELISA, le Western blot ou en immunofluorescence (62,63).

## **L'ADN**

L'oxydation de l'ADN constitue une caractéristique majeure retrouvée dans des conditions de stress oxydant accru. La base guanine est principalement touchée par les phénomènes d'oxydation de l'ADN. La guanine va réagir avec le radical hydroxyle pour former du 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG). Le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine va alors s'apparier avec l'adénine au lieu de la cytosine ce qui va induire des mutations au sein de l'ADN (53). Le radical hydroxyle peut aussi réagir avec les groupements aromatiques des bases d'ADN (64). Ces altérations de l'ADN peuvent entraîner des coupures de l'ADN simple brin et double brin.

Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Certaines enzymes permettent la réparation directe de l'ADN. La réparation de l'ADN peut se faire également par excision des bases endommagées, celles-ci sont remplacées en utilisant le brin intact comme matrice. Cependant, l'efficacité de ces systèmes dépend de plusieurs facteurs comme l'âge de la cellule ou le type de cellule. De plus, si les dommages sont trop importants, la cellule va

entrer en apoptose ou dans un cycle de division cellulaire non contrôlé aboutissant à la formation de tumeurs cancéreuses.

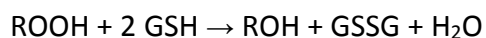
Mesurer les dommages de l'ADN peut s'avérer être délicat du fait du faible taux de dommage. Il existe plusieurs méthodes permettant d'effectuer ces mesures. Certains anticorps sont utilisés permettant de détecter les modifications au niveau de l'ADN (64). Il est possible aussi d'utiliser des enzymes de réparation de l'ADN qui vont convertir les lésions de l'ADN en cassure. Les brins d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse ou par élution (64,65). Enfin, certaines techniques de chimie analytique (HPLC) peuvent être utilisées pour mesurer les dommages de l'ADN (66).

## **II.2.5 Les systèmes antioxydants**

### **Les antioxydants enzymatiques**

#### ***La glutathion peroxydase***

Il existe cinq isoformes de la glutathion peroxydase chez les mammifères, localisées dans la mitochondrie, le noyau ou le cytoplasme. Elle possède une sélénocystéine qui est essentielle pour son activité enzymatique (67,68). Par son activité catalytique la glutathion peroxydase permet d'éliminer les hydroperoxydes, en particulier le peroxyde d'hydrogène (69). La glutathion peroxydase catalyse les réactions suivantes :

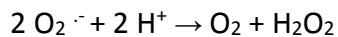


Il a été observé chez les personnes obèses, une nette diminution de l'activité de la GPx, pouvant jouer un rôle dans le développement de maladies lié à l'obésité (70,71).

#### ***Les superoxyde dismutase (SOD)***

Les superoxyde dismutases sont des métalloprotéines découvertes en 1969 par Fridovich pour la Cu/Zn SOD (SOD cytosolique) puis en 1973 pour la MnSOD (SOD mitochondriale).

Elles constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant (53). On peut distinguer 3 isoformes distinctes : la forme cytosolique (Cu/Zn SOD), la forme mitochondriale (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (Cu/Zn SOD). Les différentes SOD catalysent la même réaction :

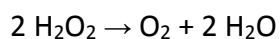


La réaction catalysée par les SOD génère du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est un composé oxydant qui pourra être éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase.

Il semblerait que la MnSOD soit très importante pour la survie. Il a été démontré que des souris dont le gène codant la MnSOD, a été invalidé (Knock Out), ne survivent que 10 à 18 jours en moyenne et présentent de nombreuses pathologies telles que des cardiomyopathies ou une dégénérescence des neurones (72–74).

### ***La Catalase***

La catalase est particulièrement présente dans les érythrocytes, le foie et parfois les reins plus particulièrement au niveau des peroxysomes (75–77). La catalase va catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène selon la réaction suivante :



La GPx permet la dégradation de faible concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors que la catalase joue un rôle important dans la dismutation de fortes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (78).

Une diminution de l'activité de la catalase a été observée chez des patients atteints de diabète de type 1 ou 2 (77,79,80). Le cas contraire a aussi été observé chez des personnes atteintes de diabète de type 1 et de type 2 (77,81,82). Les résultats concernant l'activité de

la catalase chez les personnes atteintes de diabète ou d'obésité ne sont donc pas toujours homogènes.

## **Les antioxydants non enzymatiques**

### ***Les vitamines C et E***

Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme et doivent être apportées via l'alimentation. Les vitamines C et E jouent un rôle important dans l'inhibition de la peroxydation lipidique.

La vitamine C va piéger certains radicaux libres comme le  $\text{HO}\cdot$  ou le  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mais va aussi permettre de régénérer la vitamine E oxydée (53). Cependant, il semblerait que la vitamine C joue un rôle différent en fonction de sa concentration. Ainsi, à faible concentration elle agirait comme un pro-oxydant et participerait à la formation de ROS, alors qu'à forte concentration, elle se comporterait comme un antioxydant (83–85). De plus, la vitamine C serait nécessaire pour optimiser la sécrétion d'insuline chez les personnes diabétiques (85,86). Chez les sujets diabétiques, on retrouve un taux de vitamine C plus faible que chez les sujets sains (87–89). A ce jour, l'origine de ces taux faibles reste objet de recherche.

Il existe cinq isomères de la vitamine E, appelés tocophérol. La forme la plus abondante de la vitamine E est l' $\alpha$ -tocophérol mais la forme la plus efficace serait la  $\gamma$ -tocophérol (53). Il a été démontré chez les diabétiques, une diminution du taux de vitamine E (90–92). Cependant, on retrouve plusieurs études contradictoires concernant son rôle protecteur dans le développement de pathologies associées au diabète (92–95).

### ***Les polyphénols***

Les polyphénols sont des antioxydants présents dans les végétaux. Ils vont piéger les radicaux libres. Les polyphénols peuvent protéger contre la glycoxydation des protéines et ils sont également connus pour avoir des propriétés anti-inflammatoires (96,97). Les polyphénols contenus dans le thé vert ou autres végétaux peuvent favoriser l'absorption du

glucose dans les cellules par le biais d'un mécanisme dépendant de la PI3-kinase et qui va mimer l'action de l'insuline (98,99). Les propriétés antidiabétiques du thé vert ont aussi été démontrées *in vivo* dans un modèle animal (100,101).

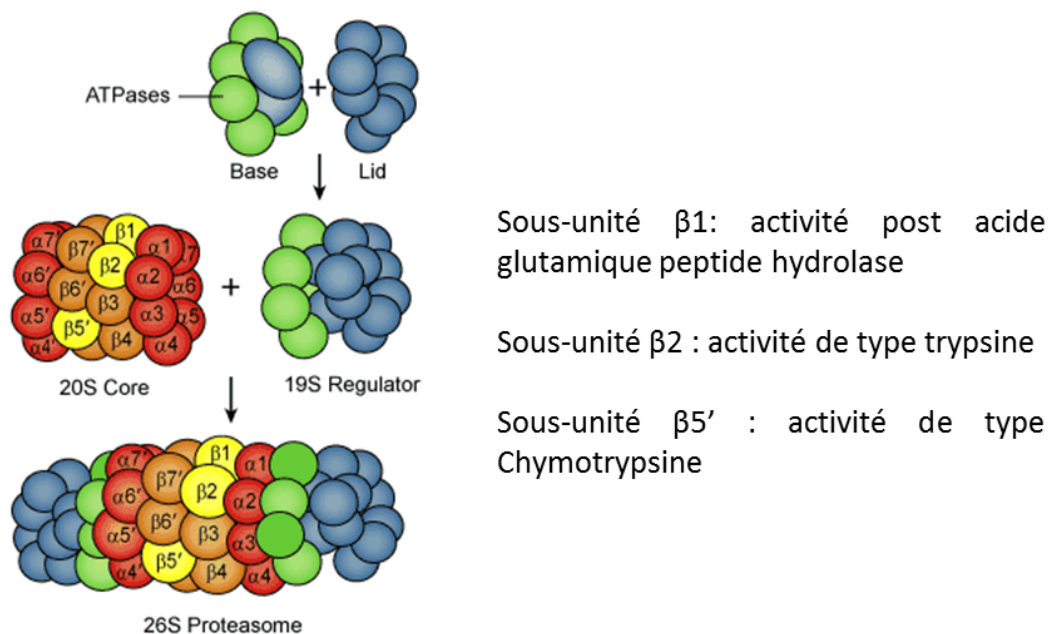
## **II.3 Le Protéasome : une machinerie cellulaire qui dégrade les protéines**

Entre 1960 et 1980, le système de dégradation des protéines était un domaine scientifique négligé et peu étudié. Cependant, entre 1978 et 1988, Aaron Ciechanover (Prix Nobel de Chimie en 2004) et son équipe mettent en évidence le Système du Protéasome : Ubiquitin Protéasome System (UPS).

Le protéasome est un complexe enzymatique multi-protéique que l'on retrouve chez les organismes eucaryotes. Il est présent dans le cytosol et dans le noyau des cellules eucaryotes et sa fonction principale est de dégrader les protéines non fonctionnelles dont les protéines oxydées (47,102,103). Le protéasome intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation des cycles cellulaires, la réponse au stress oxydatif, la réparation de l'ADN ou encore la régulation de la réponse inflammatoire (104). En effet, le protéasome est responsable de la dégradation d'I $\kappa$ B, ce qui permet d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (105). Les protéines ciblées sont marquées par l'ubiquitine puis reconnues par le système ubiquitine-protéasome (UPS) avant d'être dégradées par celui-ci. Le protéasome joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif. La dégradation des protéines oxydées permet de réduire la menace causée par la formation d'agrégats qui sont toxiques pour la cellule. Environ 70 à 80 % de la dégradation des protéines oxydées est attribué au protéasome (103,106).

Bien qu'il existe différents types de protéasome, le protéasome 26S reste le système le plus important impliqué dans la dégradation des protéines oxydées (107). Le protéasome 26S est composé de deux sous-complexes : le protéasome 20S qui est la sous-unité catalytique et le protéasome 19S qui est la sous-unité régulatrice du protéasome. La sous-unité 19S reconnaît

les protéines poly-ubiquitinilées, celles-ci sont ensuite dégradées par le protéasome 20S, qui possède 3 activités catalytiques différentes (**Figure 6**). Une activité de type caspase (ou post acide glutamique peptide hydrolase), une activité de type trypsine et une activité de type chymotrypsine, qui confèrent la capacité de cliver les liaisons peptidiques du côté de l'extrémité C-terminale des résidus d'acides aminés acides, basiques et hydrophobes, respectivement (108). A la suite de la dégradation du substrat par le protéasome de petits peptides sont relargués, ainsi que l'ubiquitine qui est réutilisée.



**Figure 6. Structure et activité du protéasome.** La sous-unité 20S du protéasome compte parmi ses sous-unités, trois sous-unités possédant chacune une activité catalytique différente. Une activité de type caspase (ou post acide glutamique peptide hydrolase), une activité de type trypsine et une activité de type chymotrypsine portées respectivement par la sous-unité  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , et  $\beta 5'$  (108).

Avec la multitude de substrats protéiques ciblés, il n'est pas surprenant que des aberrations dans le système ubiquitine-protéasome soit impliquées dans la pathogenèse de plusieurs maladies (107,104).

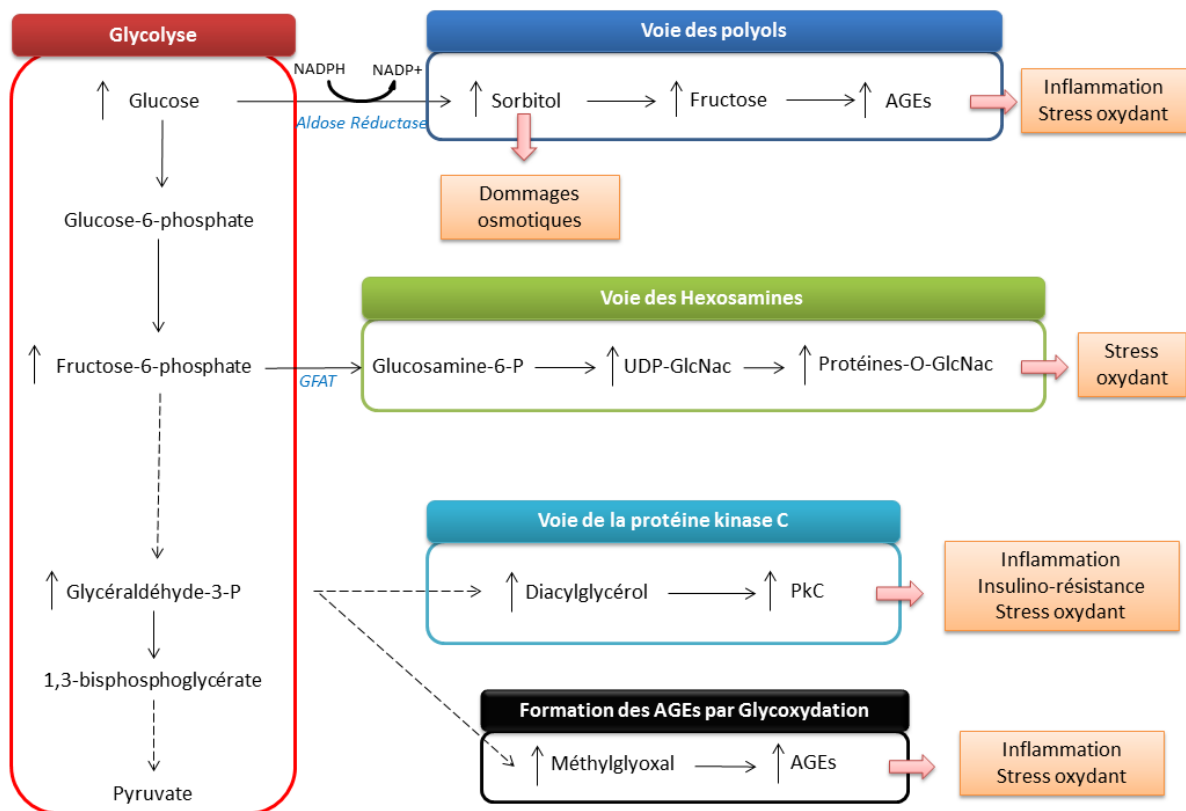


En condition de stress oxydant, on observe une augmentation du nombre de protéines oxydées poly-ubiquitinyllées (109). Il a été montré que l'inhibition des activités du protéasome entraînait une augmentation de la sensibilité au stress oxydant. Bien que le protéasome soit responsable de la dégradation des protéines oxydées, il peut lui-même être affecté par le stress oxydant (110,111). Par exemple, des agrégats de protéines peuvent interagir directement avec le protéasome et ainsi inhiber ses activités. De plus, le protéasome est susceptible d'être affecté par des modifications telles que la carbonylation ou la glycation. Il peut même interagir avec des produits de peroxydation lipidique tel que le 4-HNE (112–114). Le stress oxydant peut ainsi affecter les activités du protéasome de différentes manières. Les activités du protéasome sont normalement augmentées en condition de stress oxydant mais peuvent rapidement décliner en raison des modifications subies par le protéasome.

Il est possible de mesurer les différentes activités catalytiques du protéasome, à l'aide de substrats fluorescents tels que le MCA (7-amino-méthyl-coumarine) ou le NA (naphtylamide).

## **II.4 Toxicité du glucose**

La toxicité liée à l'hyperglycémie chronique est maintenant bien connue. Différentes voies sont activées en condition d'hyperglycémie et jouent un rôle dans le mécanisme de toxicité du glucose. Parmi ces voies activées par l'hyperglycémie, on peut citer : la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C (PKC) et les voies de formation des produits avancés de glycation (AGE) (**Figure 7**).



**Figure 7. Voies activées par l'hyperglycémie.** Quatre voies sont activées par l'hyperglycémie : la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C (PKC) et les voies de formation des produits avancés de glycation (AGE). L'activation de ces voies va entraîner une augmentation de l'inflammation et de stress oxydant.

#### II.4.1 Voie des polyols

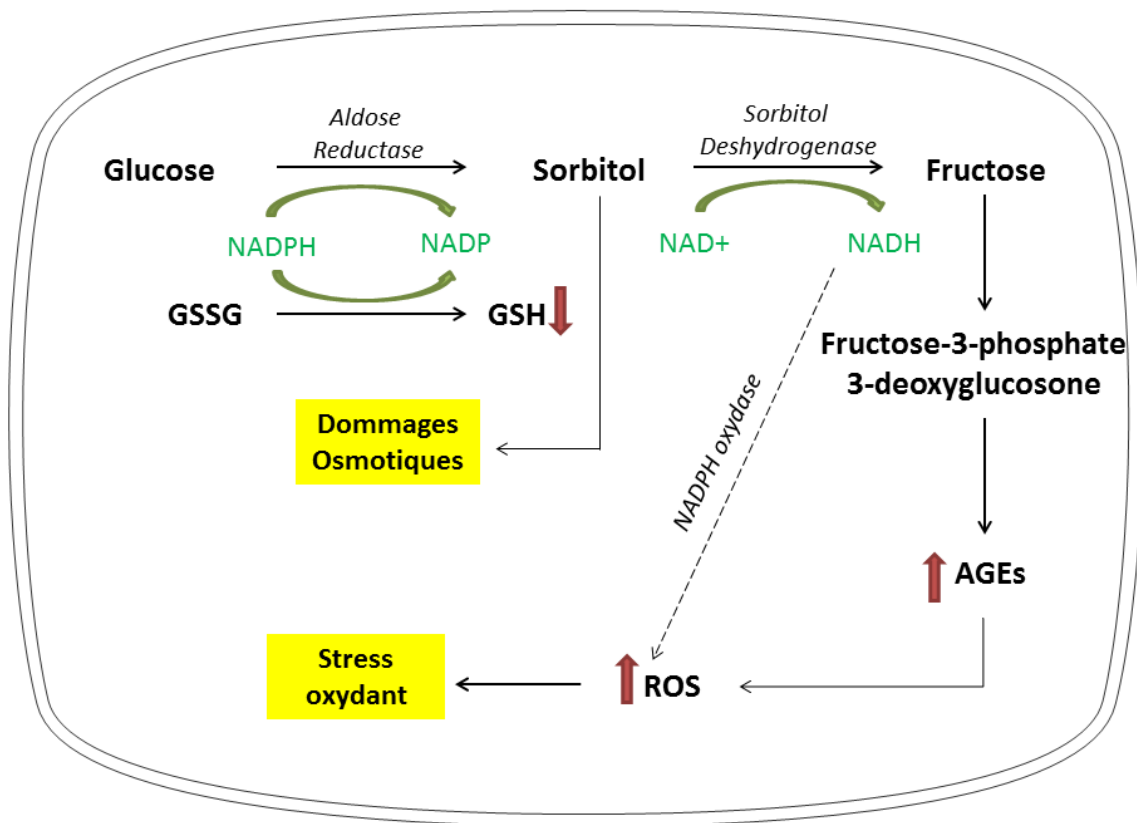
L'hyperglycémie peut entraîner une déviation d'une partie du glucose vers la voie des polyols. Dans des conditions physiologiques, la voie des polyols est inactive. Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, une partie du glucose est réduit en sorbitol par action de l'aldose réductase dont le co-facteur est le NADPH (**Figure 8**).

Le sorbitol va s'accumuler dans les cellules, de part son incapacité à traverser les membranes, et entraîner de multiples dommages tels que des dommages osmotiques.

Une partie du sorbitol peut être oxydée en fructose à l'origine de produits avancés de glycation.

De plus, l'utilisation du NADPH comme cofacteur va entraîner une diminution de la disponibilité de celui-ci pour l'activité de la glutathion réductase, importante pour la formation du glutathion réduit (53,115,116).

L'activation de la voie des polyols va ainsi entraîner une augmentation du stress oxydant au sein de la cellule avec une diminution des défenses anti-oxydantes.



**Figure 8. Voie des polyols.** L'activation de la voie des polyols va entraîner une augmentation du stress oxydant mais aussi provoquer des dommages osmotiques dus à l'augmentation du sorbitol.

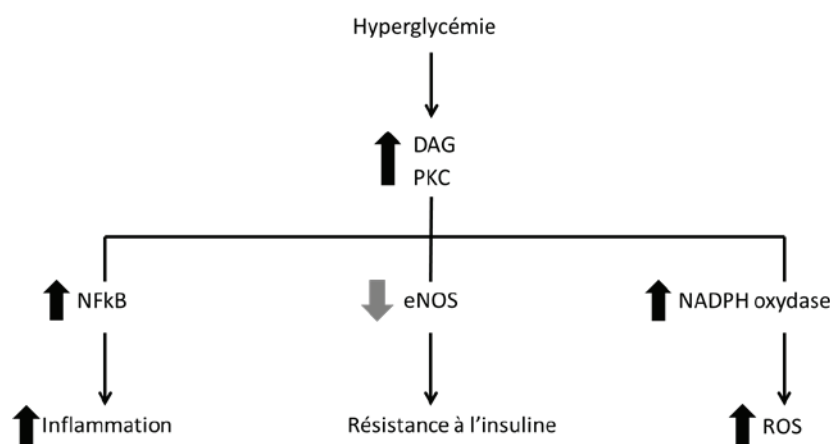
#### II.4.2 Voie de la protéine kinase C

L'augmentation du glucose va entraîner une augmentation de glycéraldéhyde-3-phosphate via la glycolyse. Le glycéraldéhyde-3-phosphate est un précurseur du diacylglycerol,

activateur de la protéine kinase C (PKC). Il a largement été démontré que le diabète entraînait une activation de la voie de la PKC (117–119).

L'activation de la PKC va entraîner l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) de par l'augmentation de l'activité NADPH oxydase. L'activation de la PKC va aussi jouer un rôle dans l'inflammation par le biais de l'augmentation de la synthèse du facteur pro-inflammatoire NFκB (69,120–122) (**Figure 9**).

L'activation de la PKC va contribuer à l'installation de l'insulino-résistance via la diminution de l'expression de eNOS (123).



**Figure 9. Voie de la PKC dans le cadre de la pathologie diabétique.** L'activation de la voie de la Pkc est notamment impliquée dans l'augmentation de l'inflammation, dans la résistance à l'insuline et dans l'augmentation du stress oxydant.

### II.4.3 Voie des hexosamines

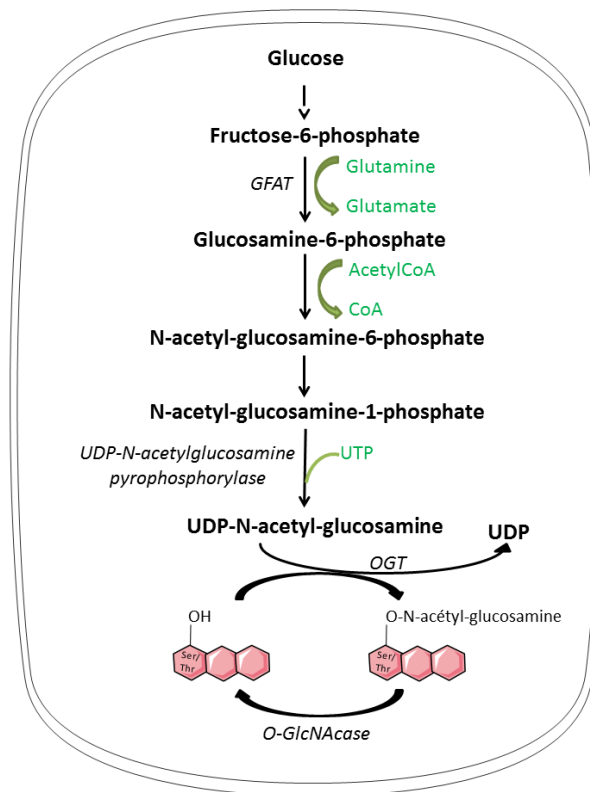
L'activation de la voie des hexosamines va aboutir à la formation de protéines O-Glycosylées (O-GlcNac). La O-GlcNac glycosylation est une modification post-traductionnelle qui implique l'addition d'un N-acétylglucosamine sur un résidu serine ou thréonine des protéines. En condition physiologique, 2 à 3% du glucose est converti en UDP-GlcNac qui est le produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines. L'élément limitant de cette voie est la glutamine-fructose 6-Phosphate aminotransférase (GFAT) (124).

En condition d'hyperglycémie, l'expression de la glutamine-fructose 6-Phosphate amidotransférase (GFAT) est augmentée (125). La glucosamine-6-phosphate ainsi formée est

transformée en UDP-N-acetyl-glucosamine (UDP-GlcNac). L'UDP-GlcNac est le substrat de l'enzyme O-GlcNac transférase (OGT) qui va catalyser la formation de protéines O-GlcNac (**Figure 10**).

L'activation de cette voie va entraîner une augmentation de la génération des ROS et contribuer à l'installation d'un stress oxydant. De plus, l'accumulation des protéines modifiées par l'O-GlcNac glycosylation joue un rôle dans les complications et l'apparition de maladies associées au diabète. (126–129).

Le phénomène de glycosylation des protéines va contribuer au phénomène de glucotoxicité du glucose dans la pathologie diabétique.



**Figure 10. Voie des hexosamines.** L'activation de la voie des hexosamines est dépendante de l'activité de la GFAT. Elle conduit à l'augmentation du taux de protéines O-glycosylées qui sont impliquées dans l'augmentation du stress oxydant.

#### II4.4 Formation des produits avancés de glycation (AGE).

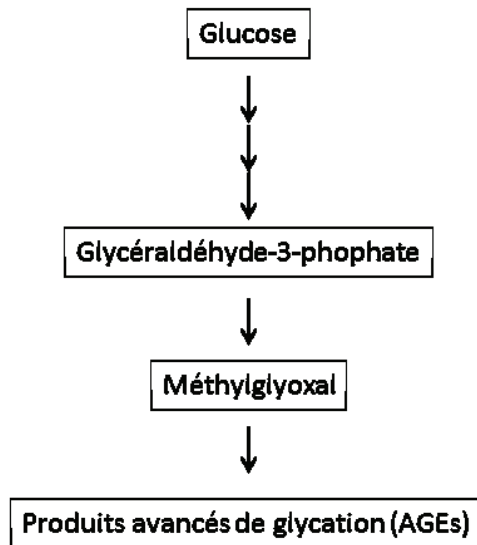
Les produits avancés de glycation sont particulièrement augmentés au cours du diabète. Ils peuvent être formés à partir de différentes voies: la voie des polyols, la glycoxydation ou auto-oxydation du glucose et la glycation représentent différentes voies pouvant conduire à la formation des produits avancés de glycation ou AGE (130). Les AGE peuvent aussi être apportés de façon exogène, par l'alimentation, en particulier si les aliments sont riches en sucres et subissent une étape de cuisson. Les AGE exogènes représentent environ 10% des AGE plasmatiques (131,132).

De nombreuses protéines peuvent être glyquées. Parmi les plus étudiées, on peut citer l'hémoglobine et l'albumine. L'hémoglobine glyquée (HbA1C) sert de marqueur pour le suivi de la glycémie sur le long terme chez les personnes diabétiques.

### **La glycoxydation ou auto-oxydation du glucose**

Une forte concentration de glucose peut conduire à une accumulation de glycéraldéhyde-3-phosphate qui est ensuite converti en méthylglyoxal. Le méthylglyoxal est un précurseur de la formation des AGE (**Figure 11**).

Normalement le méthylglyoxal est neutralisé par des enzymes, les glyoxalases, qui nécessitent la présence de NADPH. La dépression en NADPH, utilisé par la voie des polyols, fait que le méthylglyoxal ne pourra pas être neutralisé, entraînant ainsi la glycation des protéines intracellulaires (133).

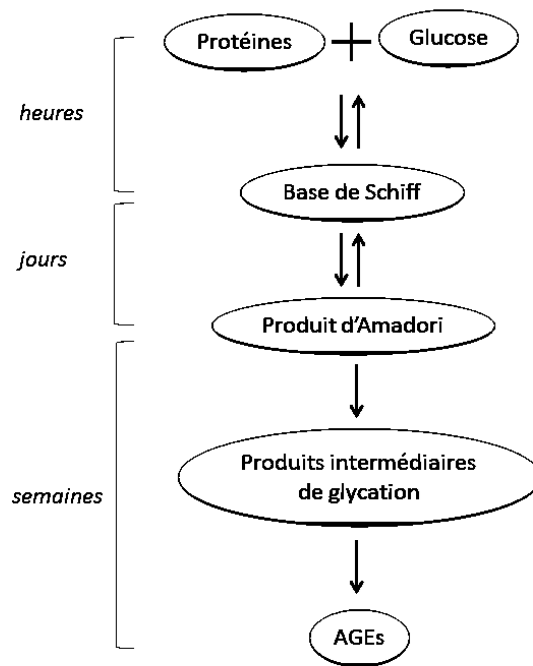


**Figure 11. Formation des AGE par la glycoxydation.**

## La glycation

La glycosylation non enzymatique ou glycation est un phénomène pathologique, intervenant dans des conditions d'hyperglycémie chronique, donnant naissance à des protéines glyquées. La formation des produits avancés de glycation (AGE) correspond à une succession d'étapes réversibles ou non, et dépendantes du temps et de la concentration en sucre. La concentration en glucose étant plus importante chez les sujets diabétiques, on peut supposer que la glycation des protéines sera plus importante.

La première étape de la glycation correspond à la réaction entre un ose (glucose, galactose, fructose) et la fonction amine libre d'une protéine pour former une base de Schiff. Cette réaction est suivie de réarrangements qui vont donner lieu à la formation de produit d'Amadori. Les produits d'Amadori subissent de nombreuses réactions oxydatives formant des intermédiaires réactifs puis aboutissant à la formation de produits finaux de glycation ou AGE (**Figure 12**) (53,134,135).



**Figure 12. Formation des AGE par la glycation.**

Les AGE peuvent se fixer sur des récepteurs de produits avancés de glycation (RAGE). La fixation des AGE sur leur récepteur va initier des voies de signalisation conduisant à l'expression de gènes codant pour des facteurs pro-inflammatoires tels que NFκB (130).

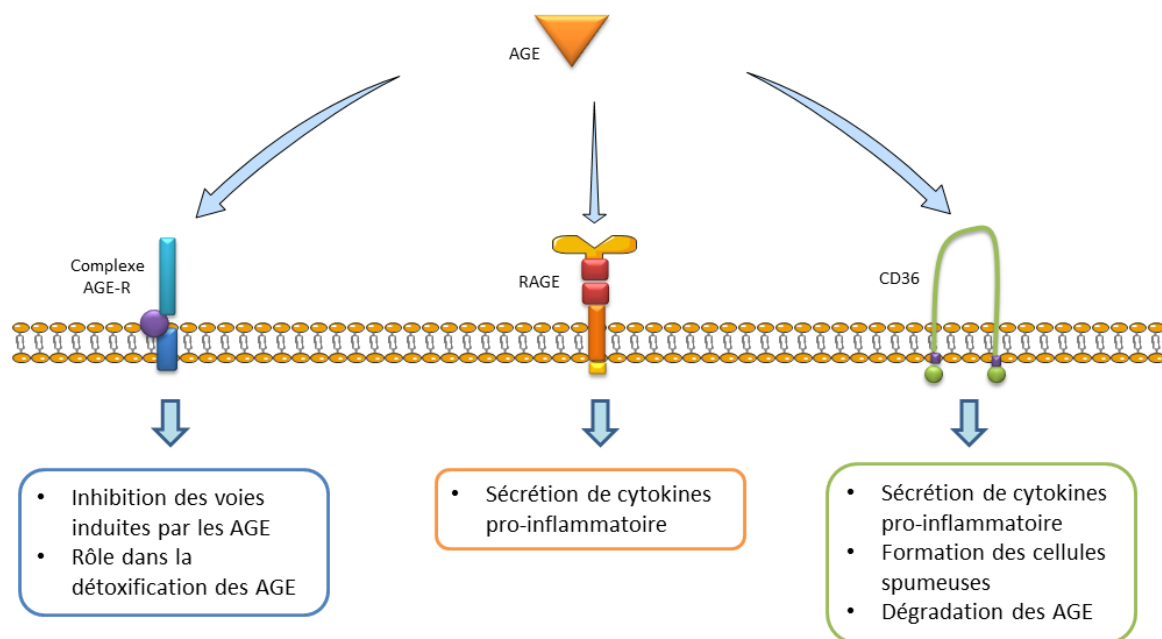
La présence d'AGE est aussi génératrice de stress oxydant et entraîne une augmentation de la production de ROS.

La présence d'AGE chez les personnes diabétiques va contribuer au développement de pathologies associées au diabète.

### **Les récepteurs des AGE**

Trois grandes familles de récepteurs aux AGE (les récepteurs RAGE, les récepteurs AGER et les récepteurs « scavenger » type CD36), ont à ce jour été identifiées. Chacun de ces récepteurs va être à l'origine de l'activation de voies de signalisation spécifiques (**Figure 13**).





**Figure 13. Les différents récepteurs des AGE (136,137).** Les trois principales voies de signalisation induites par la liaison des AGE à leurs différents récepteurs.

Le récepteur RAGE reste le plus étudié. Il s'agit d'une protéine d'environ 45 kDa faisant partie de la superfamille des immunoglobulines et présent à la surface de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses (138,139). RAGE reconnaît un grand nombre de ligand tels que les AGE, le LPS ou la protéine HMGB1 (137,140). La fixation des AGE aux récepteurs RAGE active le facteur pro-inflammatoire NFκB (137,141). L'activation du facteur NFκB va entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα ou l'IL6. De plus, la fixation des AGE sur leur récepteurs RAGE va déclencher une série de réactions qui va aboutir à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, et donc contribuer à l'augmentation du stress oxydant dans la cellule (131). Pour résumer, l'interaction entre les AGE et le récepteur RAGE va augmenter l'activité de la NADPH-oxydase ce qui va activer le facteur de transcription NFκB (137). La fixation des AGE sur les récepteurs va aussi entraîner une augmentation de l'expression du gène codant pour RAGE lui-même. Il va donc y avoir une augmentation de la signalisation induit par la fixation des AGE sur les récepteurs RAGE. Deux systèmes principaux sont responsables de la dégradation des protéines, lipides et ADN oxydés ou endommagés : les systèmes lysosomal

et protéasomal. Les AGE peuvent induire une altération dans l'assemblage et l'activité du protéasome (137,142). De plus, l'augmentation de ROS via l'interaction AGE-RAGE va entraîner une diminution du facteur SIRT1 (survival factor 1), impliqué dans la répression de la réponse inflammatoire. SIRT1 joue aussi un rôle dans la signalisation médiée par l'insuline. La diminution de l'expression de SIRT1 va ainsi entraîner une augmentation de l'inflammation et participer au défaut de signalisation de l'insuline (143). Il existe une forme soluble du récepteur RAGE, noté sRAGE, qui va empêcher la fixation des ligands sur les récepteurs RAGE ou les autres récepteurs (131,137,144). L'injection de sRAGE chez des souris diabétiques db/db va notamment entraîner une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires.

La fixation des AGE à leurs récepteurs de type AGER va avoir un effet opposé à celui entraîné par la fixation des AGE sur les récepteurs RAGE. Ainsi la fixation des AGE sur les récepteurs AGER, notamment les récepteurs AGE-R1 et AGE-R3, va jouer un rôle protecteur contre le stress oxydant et entraîner la dégradation des AGE (145,146). En condition normale, la présence d'AGE induit une augmentation de l'expression des récepteurs AGER. La liaison des AGE au récepteur AGER provoque une diminution de l'expression des récepteurs RAGE ce qui va prévenir l'apparition d'un stress oxydant. Cependant, au cours du vieillissement ou dans le cas de pathologie telles que le diabète ou l'insuffisance rénale, on observe une diminution de l'expression et de la fonction des récepteurs AGER entraînant une diminution des défenses anti-oxydantes et l'augmentation du stress oxydant (137,146–148).

Les récepteurs scavengers sont des récepteurs capables de reconnaître les LDL oxydés ou acétylés (136,137). Il existe un grand nombre de récepteurs scavenger identifiés et classés selon leurs propriétés structurales. Parmi eux on retrouve les récepteurs scavengers de classe A (SR-A) et les récepteurs scavengers de classe B (SR-B) parmi lesquels le récepteur CD36. Les récepteurs SR-A et CD36 sont exprimés par les macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques et peuvent lier les LDL oxydées. Le récepteur CD36 est également exprimé au niveau des cellules adipocytaires murines 3T3L1 et des adipocytes humains. Il est capable de reconnaître l'albumine glyquée par le méthylglyoxal. La fixation des AGE sur les récepteurs scavengers pourrait jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose mais aussi dans le développement des complications liées au diabète en diminuant la sensibilité à l'insuline (149–152).

## **II.5 L'Albumine glyquée : un modèle de stress oxydant**

L'albumine est une protéine synthétisée par le foie et libérée dans la circulation sanguine. Avec une concentration de 40 g/L, elle représente environ 60 % des protéines plasmatiques. L'albumine est de ce fait la protéine circulante la plus abondante. (153,154). Son temps de demi-vie particulièrement longue (20 jours) fait d'elle une cible privilégiée pour les réactions de glycoxydation et de glycation. Ces réactions s'accompagnent d'une altération de sa structure et de sa fonction.

L'albumine possède de nombreuses fonctions au niveau de l'organisme. Elle participe à la régulation de la pression osmotique et du pH sanguin. Elle possède également des propriétés anti-oxydantes mais aussi de transport des hormones hydrophobes et de protection. L'albumine est ainsi capable de neutraliser des agents toxiques exogènes ou endogènes diminuant ainsi leur effets toxiques dans l'organisme (155). Sa capacité anti-oxydante résulte du fait qu'elle est capable de lier les ions métalliques tels que le cuivre, ainsi que les hydroperoxydes mais elle est aussi capable de neutraliser les radicaux libres (156,157).

Toutes les propriétés de l'albumine sont liées à sa structure. La glycation de l'albumine va modifier la structure de la protéine et donc ses propriétés de transport et ses fonctions anti-oxydantes (158). Les modifications oxydatives peuvent aussi affecter le métabolisme du glucose au niveau des cellules musculaires et des adipocytes. Dans d'un modèle cellulaire adipocytaire, il a été démontré que l'albumine glyquée est à l'origine de l'augmentation de la production de ROS, conduisant à une inhibition de l'absorption du glucose. De plus, l'albumine glyquée contribue aux modifications intracellulaires des protéines des cellules adipocytaires (159–162).

Chez les personnes saines, la proportion d'albumine glyquée est de l'ordre de 1 à 10 % alors que chez les personnes diabétiques, elle est deux à trois fois plus élevée (163). La présence d'albumine glyquée est directement impliquée dans le développement de maladies liées au diabète de type 2 telles que les néphropathies (164).

Chez les personnes diabétiques, on observe une augmentation du taux d'albumine glyquée. Ainsi, l'albumine glyquée peut servir, au même titre que l'hémoglobine glyquée (HbA1C), de marqueur du suivi de la glycémie à moyen terme chez les personnes diabétiques (153). Chez les personnes diabétiques, l'hémoglobine glyquée sert de marqueur pour contrôler la glycémie sur le long terme. En effet, sa demi-vie est d'environ 120 jours alors que la demi-vie de l'albumine est de 20 jours. Cependant, dans certain cas, la mesure de l'hémoglobine glyquée ne peut être utilisée comme marqueur de l'évolution de la glycémie. Chez les personnes atteintes d'anémie hémolytique ou de cirrhose hépatiques, les taux de l'HbA1C sont faussés. La mesure de l'albumine glyquée n'est pas altérée dans ces pathologies (163,165–167). De plus, en raison de sa demi-vie plus courte que celle de l'hémoglobine, la mesure de l'albumine glyquée semble être un meilleur marqueur des changements à court terme de la glycémie. L'albumine glyquée est par ailleurs utilisée comme marqueur de contrôle de la glycémie pour les femmes atteintes de diabète gestationnel (154,163,168). La mesure simultanée de l'hémoglobine glyquée et de l'albumine glyquée permettrait donc un meilleur suivi du statut glycémique des personnes diabétiques.

Il existe différentes méthodes permettant d'isoler et de mesurer les taux d'albumine glyquée. Ces méthodes comprennent la chromatographie, des tests colorimétriques (test BCG) ou enzymatiques ainsi que des tests immunologiques (ELISA). Le dosage des fructosamines est un des tests colorimétrique permettant de mesurer le taux de protéines glyquées et est utilisé aussi bien par les laboratoires de recherche que les laboratoires cliniques (153,169,170). Comme l'albumine est la protéine la plus abondante du plasma, le dosage des fructosamines reflète en majorité le taux de glycation de l'albumine.

Depuis de nombreuses années, des études ont pu être menées sur le processus de glycation de l'albumine *in vitro* ainsi que sur son impact en tant que générateur de ROS, afin d'étudier ses effets physiopathologiques. Cette oxydation s'effectue souvent en présence de méthylglyoxal ou de sucres tels que le glucose ou le fructose. Il faut attendre plusieurs jours à plusieurs semaines pour que le processus de glycation s'effectue. Le processus de glycation peut par ailleurs être suivi visuellement grâce à la formation d'un composé brun (171,172). L'albumine ainsi glyquée peut être utilisée sur des modèles cellulaires pour étudier le stress oxydant. Les études effectuées à ce sujet ont montré que des cellules incubées en présence

d'AGE, présentaient une augmentation du taux de protéines intracellulaires oxydées ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (173,174).

## **II.6 Les souris db/db : un modèle de diabète de type 2**

### **II.6.1 Caractéristiques du modèle**

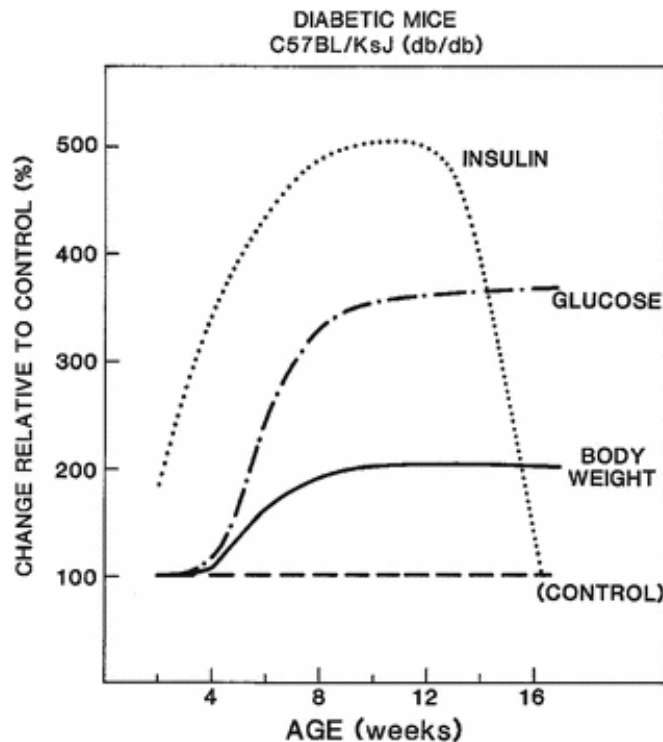
La souris db/db est un des modèles de diabète de type 2 les plus utilisés en recherche depuis quarante ans. Chez les souris db/db, le récepteur à la leptine est non fonctionnel. La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux et responsable notamment du signal de satiété (175). Chez les souris db/db, il y a production de leptine mais celle-ci reste sans effet en raison de l'absence de récepteur.

Le défaut de signalisation de la leptine entraîne chez ces souris une obésité due à une hyperphagie et à une baisse de la dépense énergétique. L'obésité chez les souris db/db est visible dès la quatrième semaine de vie, avec une augmentation du nombre (hyperplasie) et de la taille (hypertrophie) des adipocytes.

Chez les souris db/db, on observe tout d'abord une hyperinsulinémie avec un pic d'insuline aux alentours de trois mois. Cette hyperinsulinémie agit comme un mécanisme compensatoire pour maintenir la glycémie à des taux moins élevés (**Figure 14**) (176,177). Par la suite, une diminution de la sécrétion de l'hormone, c'est-à-dire une insulinopénie, apparaît due à la destruction des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline.

Une hyperglycémie constitue un paramètre caractéristique des souris db/db. L'hyperglycémie se développe au bout d'environ deux mois et peut atteindre des valeurs allant jusqu'à 400 voire 600 mg/dl contre environ 150 mg/dl chez les souris contrôles (175,178,179).

Une autre caractéristique des souris db/db consiste en une hyperlipidémie principalement due à l'augmentation des taux de HDL.



**Figure 14.** *Progression des caractéristiques des souris db/db au cours du temps (177). Evolution du taux d'insuline, de glucose et du poids chez les souris db/db comparé à des souris contrôles au cours du temps.*

## II.6.2 Différences entre le modèle db/db et les personnes atteintes de diabète de type 2

Malgré des caractéristiques communes retrouvées chez les diabétiques de type 2, il existe quelques différences entre le modèle de souris db/db et les personnes atteintes de diabète de type 2 (**Tableau 1**). Tout d'abord, si chez les souris db/db, l'obésité est due à l'hyperphagie causée par un défaut de signalisation de la leptine, chez l'homme, l'obésité est principalement due à un mauvais mode de vie et d'autres causes génétiques, bien que chez certaines personnes on retrouve une résistance à la leptine (175,180). De plus, l'obésité est plus modérée et variable chez les Hommes par rapport à celle des souris db/db.

Ensuite, chez les souris db/db on retrouve une hyperinsulinémie plus sévère que chez les sujets atteints de diabète de type 2. La destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques est aussi plus importante chez les souris db/db comparée aux personnes atteintes de diabète de type

2 (environ 10% chez l'Homme) (175,181,182). L'insulino-résistance est présente aussi bien dans le modèle murin db/db que chez les personnes diabétiques.

De plus, l'hyperglycémie chez les souris diabétiques (400 à 600 mg/dl) est 2 à 3 fois plus élevée que chez les sujets diabétiques (200 mg/dl).

Enfin, au niveau du bilan lipidique, on notera que la dyslipidémie chez les souris db/db est principalement due à une augmentation du taux de HDL. Les LDL ne varient pas ou ont parfois tendance à diminuer. Chez les patients diabétiques de type 2, un bilan lipidique inverse à celui retrouvé chez les souris db/db est observé. Ainsi, on observe une diminution du taux de HDL et une augmentation de LDL (175). Les LDL sont des particules hautement athérogéniques dues à leur haute sensibilité aux modifications oxydatives (183).

**Tableau 1. Comparaison des caractéristiques entre les souris db/db et les sujets diabétiques de type 2 (175)**

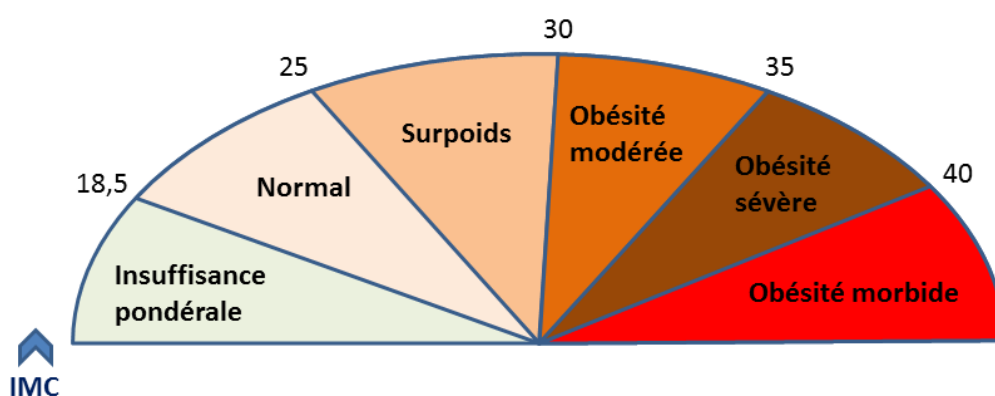
	<b>Souris db/db</b>	<b>Personnes atteinte de diabète de type 2</b>
<b>Obésité</b>	Obésité sévère due à une hyperphagie causée par un défaut de signalisation de la leptine	Obésité modérée à sévère - causes multiples
<b>Dyslipidémie</b>	↑ HDL	↓HDL, ↑ LDL
<b>Hyperglycémie</b>	Sévère	Modérée
<b>Hyperinsulinémie</b>	Sévère (jusqu'à 3 mois)	Modérée
<b>Atteinte des cellules β-pancréatique</b>	Oui	Oui
<b>Insulino-résistance</b>	Oui	Oui
<b>Complications</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durée de vie trop courte pour simuler les complications retrouvées chez l'homme</li> <li>- Ne développe pas d'athérosclérose</li> <li>- Pas d'hypertension</li> <li>- Diminution contraction cardiaque</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Athérosclérose</li> <li>- Hypertension</li> <li>- Neuropathie, Néphropathie, Rétinopathie,...</li> </ul>

## II.7 Le tissu adipeux et le tissu cardiaque : cibles du stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications et progression de pathologies. Le stress oxydant est un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (48,184).

### II.7.1 L'obésité : facteur d'apparition du diabète de type 2

L'obésité et le surpoids seraient les facteurs les plus importants conduisant à l'apparition de maladies métaboliques telles que le diabète. Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale et excessive de graisse qui nuit à la santé. L'indice de masse corporel (IMC) et la mesure du tour de taille sont des outils permettant de mesurer l'obésité au sein de la population. L'IMC se calcule en divisant le poids d'un individu en kg par sa taille, en mètre, au carré. Ainsi, un IMC supérieur à 25 correspond à un surpoids tandis qu'un IMC supérieur à 30 correspond à celui d'une personne obèse (**Figure 15**) (185,186).



**Figure 15.** Classification en fonction de l'IMC.



La prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter dans le monde non seulement chez les adultes mais aussi chez les enfants et les adolescents. Les causes de l'obésité sont multiples : génétique, métabolique,... mais peuvent principalement être attribuées à un excès de consommation d'aliments gras et sucrés associé à une inactivité physique (187–189). L'obésité est responsable d'une diminution de la qualité de vie, de l'apparition de maladies sévères et de l'augmentation de la mortalité. Les risques de développer des maladies cardiovasculaires, cancer ou autres maladies métaboliques ainsi que la morbidité augmentent avec l'IMC (190,191).

L'obésité est associée à une inflammation chronique de faible intensité qui va activer le système immunitaire et ainsi augmenter le statut inflammatoire du tissu adipeux et générer un stress oxydant (186,192). L'inflammation chronique et le stress oxydant du tissu adipeux sont associés au développement de maladies cardiovasculaires, de cancer, de l'insulino-résistance et donc de l'installation d'un diabète de type 2.

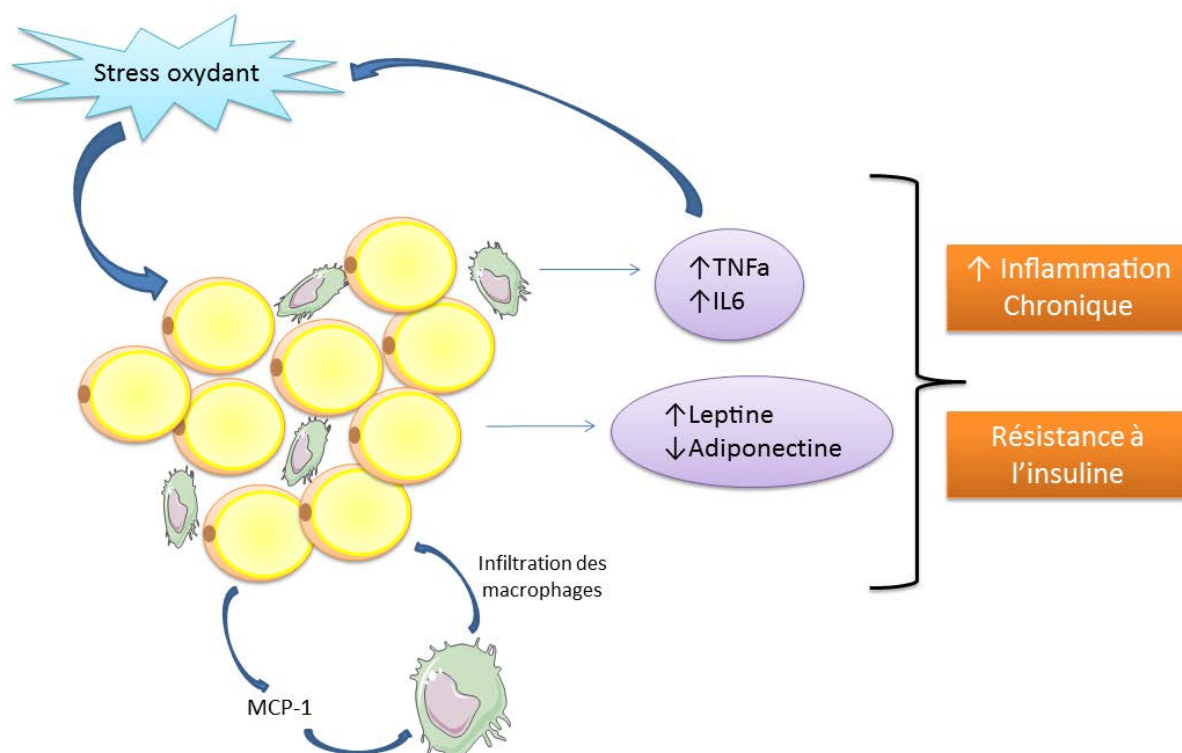
Le tissu adipeux et les cellules qui le compose jouent un rôle important dans les pathologies associées à l'obésité tel que le diabète de type 2.

### **II.7.2 Stress oxydant et tissus adipeux**

Chez une personne normo-pondérée, le tissu adipeux représente environ 15 à 25 % du poids total et il peut atteindre 50% du poids total chez les personnes obèses (193,194). Le tissu adipeux possède deux fonctions principales. Le tissu adipeux a d'abord été caractérisé comme un tissu de stockage. Il permet ainsi le stockage et la libération des lipides, gérant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins de celui-ci. Aujourd'hui, le tissu adipeux est aussi considéré comme un tissu endocrinien qui sécrète des cytokines ou des adipokines qui vont agir soit de manière locale, au niveau même du tissu adipeux, soit au niveau d'autres organes (195–197). Le tissu adipeux est principalement composé d'adipocytes mais aussi de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules immunitaires. Il existe en réalité deux types de tissu adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun joue principalement un rôle dans la régulation thermique alors que le tissu adipeux blanc est davantage impliqué dans le maintien des réserves énergétiques. (198,199). Le stockage et la libération des lipides sont sous l'influence de

certaines hormones telle que l'insuline, l'adrénaline ou le glucagon, et la dérégulation au niveau des voies de signalisation impliquant ces hormones joue un rôle dans l'apparition de pathologie dont le diabète de type 2.

Dans des conditions physiologiques mais surtout en condition pathologique, la sécrétion d'adipokines s'accompagne de la production d'espèces réactives de l'oxygène générant ainsi un stress oxydant à l'origine de la sécrétion d'autres adipokines (71,186). La leptine est une adipokine sécrétée par les cellules adipeuses et est responsable du signal de satiété de par ses effets anorexigènes. Chez les personnes obèses, on retrouve des taux élevés de leptine, ce qui laisse à supposer que les personnes obèses développeraient une résistance à cette hormone (175). La leptine contribue à augmenter le stress oxydant et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'adiponectine est une autre adipokines possédant des propriétés anti-inflammatoires. L'exposition des cellules à un stress oxydant prolongé diminue fortement l'expression et la sécrétion d'adiponectine par les cellules. De plus, l'obésité va entraîner une accumulation de lipides dans la cellule adipeuse ce qui va activer la cascade de la voie de signalisation médiée par NFkB et ainsi entraîner la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire telles que TNF $\alpha$  et IL6 (192,200). Cette sécrétion de cytokines pro-inflammatoire, en particulier de TNF $\alpha$ , entraîne une activation de la voie JNK (c-JUN N-terminale kinase), inhibant la réponse insulinaire et contribuant à l'installation de l'insulino-résistance (**Figure 16**). La présence d'un statut inflammatoire va entraîner le recrutement de cellules immunitaires, en particulier de macrophages qui vont eux-mêmes sécréter des cytokines inflammatoires et participer au dysfonctionnement du tissu adipeux. Le stress oxydant et l'inflammation sont étroitement liés de par la génération de ROS favorisant l'installation d'une inflammation chronique et d'une stimulation de la production de ROS induite par les cytokines pro-inflammatoires.



**Figure 16. Physiopathologie adipocytaire.** Le stress oxydant va induire une dérégulation de la sécrétion d'adipokines et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Cela va entraîner une infiltration des macrophages dans le tissu adipeux qui vont participer à l'inflammation. La présence d'un statu pro-inflammatoire va aussi contribuer à l'augmentation du stress oxydant. La présence d'une inflammation chronique va entraîner une baisse de la sensibilité à l'insuline.

La NADPH oxydase et en particulier la NADPH oxydase 4 (NOX4) est responsable de la majeure production de ROS au niveau du tissu adipeux. Les ROS générés par la NADPH oxydase vont avoir pour cible principale la mitochondrie ce qui va augmenter la production de ROS à la fois par NOX4 mais aussi par la mitochondrie elle-même (186,201). De plus chez les personnes obèses, on observe une diminution des défenses anti-oxydantes incluant une diminution de l'activité de la SOD, de la catalase mais aussi une diminution du taux de vitamine C et E dans l'organisme. Il est maintenant reconnu qu'un stress oxydant prolongé peut entraîner un défaut du métabolisme du glucose au niveau adipocytaire (186). Le stress oxydant généré au niveau adipocytaire, va également être à l'origine d'une activation de la

voie JNK (c-JUN N-terminale kinase) et ainsi contribuer à l'installation de l'insulino-résistance.

La présence de récepteurs RAGE et CD36 a été montrée dans des modèles de cellules adipocytaires. Ces récepteurs sont capables de reconnaître et de fixer les produits avancés de glycation, conduisant à la formation de ROS (151,152,202). Il existe cependant très peu d'étude concernant le rôle des AGE au niveau des adipocytes. Les adipocytes traités avec des AGE vont avoir un taux de protéines oxydées qui sera augmenté et accompagné par un défaut des activités du protéasome. Les AGE vont aussi entraîner une diminution de l'adiponectine produite par les adipocytes, contribuant au développement de l'insulino-résistance (203,204).

### **II.7.3 Stress oxydant et complications cardiovasculaires chez les diabétiques**

Un lien très étroit existe entre le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de décès chez les personnes diabétiques (205–207). Les personnes diabétiques ont deux à quatre fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires que les individus non diabétiques. Le stress oxydant et l'inflammation joueraient un rôle direct dans le développement des maladies cardiovasculaires.

La surexpression de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux, favorise l'inflammation et l'accumulation de lipides exerce des effets néfastes sur les vaisseaux sanguins et donc contribue à l'apparition de cardiomyopathies. Chez les personnes diabétiques, on observe une augmentation du taux de LDL comparé à celui mesuré chez les individus non diabétiques. En condition d'hyperglycémie, ces LDL vont être soumises à des phénomènes d'oxydation et de glycation. Les LDL oxydées ou les LDL glyquées vont être captées par des macrophages aboutissant à la formation des cellules spumeuses (208–210). Les cellules spumeuses participent à la formation de plaques d'athéromes, à la base du développement de l'athérosclérose, et va augmenter le risque de maladies cardiovasculaires et d'ischémie cardiaque chez les personnes diabétiques. De plus, en présence de LDLox, des

cytokines telles que TNF $\alpha$  ou IL-1, sont sécrétées et participent à l'augmentation de l'inflammation (210,211).

L'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) catalyse la production d'oxyde nitrique responsable de la vasodilatation des vaisseaux sanguins. En condition d'hyperglycémie, l'activité NADPH oxydase accrue est responsable d'une production d'anion superoxyde qui inhibe l'activité de eNOS et la production d'oxyde nitrique est ainsi diminuée (207,212,213). De plus le stress oxydant va favoriser l'activation du facteur NF $\kappa$ B ce qui va conduire à une surproduction de cytokines inflammatoires. Enfin, on observe une diminution de l'activité des défenses enzymatiques dont la SOD mais aussi une diminution de l'activité de type trypsine du proteasome.

Les risques accrus chez les personnes diabétiques, de développer des maladies cardiovasculaires peuvent trouver leur origine dans un défaut de l'homéostasie glycémique associé à l'obésité et la dyslipidémie.

### **III. Objectifs du travail**

L'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires sont étroitement liés avec comme facteurs communs, le stress oxydant et l'inflammation. Chez les personnes diabétiques, les cellules adipocytaires et les cellules cardiaques sont particulièrement sensibles au stress oxydant. Les dommages de type oxydatif participent à la progression de la physiopathologie diabétique. L'objectif de ma thèse a ainsi consisté à étudier l'impact du stress oxydant induit par une hyperglycémie ou l'albumine glyquée sur les dommages oxydatifs adipocytaire et cardiaque.

Tout d'abord, j'ai étudié et comparé l'impact d'une hyperglycémie chronique ou intermittente, mimant une hyperglycémie postprandiale, sur les dommages de type oxydatifs d'un modèle adipocytaire humain, les cellules SW872. Ce travail a donné lieu à une publication sous forme d'article intitulé : « Hyperglycemia induces oxidative damages in SW872 » (*Boyer et al. 2014*)

Par la suite, j'ai pu participer à la caractérisation de dommage de type oxydatif dans le modèle de diabète de type 2, les souris db/db. Je me suis intéressée tout d'abord aux modifications oxydatives des protéines au niveau circulatoire et hépatique des souris diabétiques. Puis je me suis intéressée aux activités du protéasome hépatique des souris diabétiques. Ce travail a donné lieu à une publication sous forme d'article intitulé : « Diabetes-induced hepatic oxidative stress : a new pathogenic role for glycated albumin » (*Patche et al.*), actuellement en cours de soumission

Dans la troisième partie de mon travail, je me suis focalisée sur le tissu adipeux provenant de ces souris diabétiques. J'ai pu ainsi caractériser les dommages oxydatif adipocytaire chez un animal diabétique et les comparer avec un modèle de cellules adipocytaires murines (lignée 3T3L1) mis en situation d'hyperglycémie ou traité avec l'albumine glyquée. Ce travail a donné lieu tout d'abord à une publication sous forme de review intitulé : « Oxidative stress and adipocytes biology : Focus on the role of AGEs » (*Boyer et al. 2015*) ; puis à un article intitulé : « Enhanced oxidative stress in adipose tissue from diabetic mice, possible contribution of glycated albumin », en cours de soumission.

Dans une quatrième et dernière partie, l'étude des dommages oxydatifs a été conduite sur un modèle de cellules cardiaques, les H9C2 et également tissulaire (cœur isolé reperfusé de rat et souris db/db). L'activation de certaines voies cellulaires, telles que la voie de la PkC et des hexosamines, a pu être identifiée. Ce travail a donné lieu à une publication sous forme d'article intitulé : « Glycation abolishes the cardioprotective effects of albumin during ischemia-reperfusion » (*Mapanga et al.*), en cours de soumission.

L'ensemble de ces travaux vise une meilleure compréhension de l'implication des dommages de type oxydatifs dans les dysfonctionnements adipocytaires et cardiaque dans le cadre de la pathologie diabétique. Ces travaux sont présentés dans la partie **résultats**.





## **IV. Matériels et méthodes**

## **Souris db/db**

Les souris C57BLKs/J+/Lepr<sup>db</sup> (souris db/+) proviennent du laboratoire Charles Rivers. Après reproduction et croisement, elles ont été séparées en trois groupes (n=10 à 15 par groupe) : les souris C57BLKs+/+ (WT), les souris hétérozygotes C57BLKs/J+/Lepr<sup>db</sup> (db/+) et les souris homozygotes diabétiques C57BLKs/J/Lepr<sup>db</sup>/Lepr<sup>db</sup> (db/db). Les animaux ont été placés dans un environnement contrôlé, avec une température constante (21±2°C), une humidité de 50 ±5% et des cycles de lumière-obscurité de 12 heures chacun. Les souris disposaient de nourriture et d'eau *ad libitum*. Toutes les expérimentations animales ont été conduites avec l'accord du comité d'éthique de Cyclotron Réunion Océan Indien (CYROI) (projet n° 01268.01).

## **Mesure des paramètres métaboliques**

De quatre à douze semaines, le poids des animaux est déterminé ainsi que la glycémie grâce au « OneTouch® Ultra Blood Glucose Monitoring System ». A 12 semaines les souris sont euthanasiées. Le sang est collecté par ponction cardiaque dans des tubes EDTA Vacutainer®. Les protéines totales, l'insuline, les fructosamines, les triglycérides, le cholestérol total, les Lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) ont été mesurées à partir du plasma grâce à l'utilisation d'un automate de biochimie clinique : le Cobas C501 analyzer (Roche Diagnostic).

## **Culture et traitement des cellules 3T3L1 et SW872**

Les cellules pré-adipocytaires 3T3L1 et SW872 ont été cultivées dans du « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM) contenant 25 mM de glucose et supplémenté avec de la pénicilline (100U/ml), streptomycine (100U/ml), de la L-glutamine (2mM) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humide comportant 5% de CO<sub>2</sub> et à 37 °C.

Pour les traitements cellulaires, les cellules sont placées pendant 24 heures dans du DMEM à 5 mM de glucose dans des plaques 96 puits (10 000 cellules/puits), pour les tests DCFH-DA, Crystal violet, et MTT, et en boîte de Pétri de 21 cm<sup>3</sup>, pour l'isolement des protéines ou de

l'ARN. Les cellules sont traitées pendant 1h, 3h ou 6h dans des conditions d'hyperglycémie (25 ou 33 mM de glucose) ou en présence d'albumine native ou glyquée (80  $\mu$ M de BSA).

### **Culture et traitement des cellules H9C2**

Les cellules de cardiomyoblastes de rat H9C2, ont été cultivées dans du DMEM contenant du GlutaMAX™, 5,5 mM de glucose et supplémenté avec de la pénicilline (100U/ml), streptomycine (100U/ml) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Pour les traitements des cellules, celles-ci sont placées dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules ont atteint 90% de confluence, elles sont mises en condition d'hyperglycémie (25 mM de glucose) et/ou avec de l'albumine native ou glyquée (10  $\mu$ M ou 80  $\mu$ M) pendant 6h et 24h dans du milieu à 1% de SVF.

### **Glycation de l'albumine**

La sérum albumine bovine (BSA) a été préparée à 40 g/L dans du PBS. Le méthylglyoxal (MGO) est ajouté à une concentration finale de 10 mM. La BSA-MGO et la BSA native, sont incubées pendant quatre jours à 37°C dans le noir et sous agitation. Les préparations d'albumine, ont ensuite été dialysées contre une solution de PBS puis filtrées grâce à un filtre Millipore 0,2 $\mu$ m et stockées à -20°C jusqu'à utilisation. La mesure de la concentration finale de BSA a été effectuée grâce à un test Bradford.

Un dosage des fructosamines est réalisé pour l'albumine native et l'albumine glyquée. Le dosage est réalisé à partir du protocole de *Johnson et al.* (214) et utilise le nitroblue tetrazolium (NBT) comme réactif. Le résultat a été exprimé en nmol de 1-deoxy-1-morpholinod-fructose (DMF)/ $\mu$ M de BSA.

La mesure des groupements thiols, au niveau de l'albumine native et glyquée, a été réalisée grâce à la méthode d'Ellman (49) qui utilise l'acide 5, 5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic (DTNB) comme réactif. Le résultat est exprimé en nmol/ $\mu$ M de BSA.

### **Viabilité cellulaire**

*Bleu trypan.* La viabilité cellulaire des cellules SW872 a été déterminée par comptage au bleu trypan. Le bleu trypan va pénétrer l'ensemble des cellules mais sera expulsé des vivantes par transport actif de sorte que ne seront colorées que les cellules mortes. 5 µl de solution de bleu trypan à 0,4% ont été ajoutés à 45 µl de suspension cellulaire. Après 5 minutes, les cellules sont comptées grâce à une cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

*MTT.* Le test MTT a été choisi afin d'évaluer l'effet de la BSA-MGO et de l'hyperglycémie sur la viabilité cellulaire. Le principe du dosage repose sur la mesure de l'absorbance des cristaux de formazan, résultant de la réduction du MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. 20 µL de MTT (5 mg/ml) est additionné à chaque puits suivi par une incubation de 3 heures. Le milieu est ensuite enlevé et 100 µL de DMSO est ajouté, la plaque est mise à agiter à l'obscurité jusqu'à dissolution des cristaux de formazan. L'absorbance est mesurée à 595 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage (%) par rapport au contrôle.

*Cristal Violet.* Les cellules adhérentes (et hypothétiquement vivantes) après les différents traitements ont été détectées par la mesure de l'absorbance du réactif crystal violet présentant une forte affinité pour le noyau des cellules. Après traitement cellulaire, le milieu est enlevé et 50 µL de cristal violet à 0,25% est ajouté à chaque puits. Les cellules sont incubées en présence du cristal violet pendant dix minutes puis lavées avec de l'eau par immersion. La plaque est mise à sécher à l'air libre avant l'addition de 100 µL de SDS à 1%. La plaque est mise à agiter jusqu'à uniformisation de la couleur puis l'absorbance est lue à 595 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

### **Préparation des homogénats cellulaires et tissulaires**

*Cellules SW872 et 3T3L1.* Après traitements, les cellules sont lavées avec du PBS et 500 µL de tampon de lyse (Tris 25 mM pH 8,3, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, Triton 1%) sans inhibiteur de protéase, sont ajoutés par boîte. Après 5-10 minutes dans la glace, les cellules sont décollées par grattage et soniquées quelques secondes. Elles sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes, à 10 000 g, à 4°C. Pour la réalisation des Western Blot, le même tampon de lyse avec inhibiteur de protéase à 0,5 X final, est utilisé. Pour le Dot Blot carbonyl et l'ELISA

Carbonyl des cellules SW872, un tampon utilisant du DMSO pur plus 0,5% de TFA (acide trifluoroacétique), a été utilisé.

*Cellules H9C2.* Après traitements, les cellules sont lavées avec du PBS et 500 µL de tampon de lyse (Tampon RIPA, Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 1 µg/ml, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, Pepstatin 1 µg/ml, PUGNAc 1 mM) sont ajoutés par boîte de culture. Après 5-10 minutes dans la glace, les cellules sont décollées par grattage et soniquées quelques secondes. Elles sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes, à 10 000 g, à 4°C.

*Tissus.* Les tissus adipeux et cardiaques sont broyés à l'aide d'un appareil d'homogénéisation (tissuelyser, Qiagen), réglé à 25 Hz d'amplitude, pendant 1 à 2 minutes, et ce dans le même tampon de lyse que celui utilisé pour les cellules SW872 et 3T3L1. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes, à 10 000 g, à 4°C et le surnageant est récupéré et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Le dosage de la concentration des protéines dans les échantillons est réalisé grâce au test de Bradford (215). Le principe du test repose sur le changement d'absorbance du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. L'absorbance à 595 nm est ainsi proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon et est comparée à une gamme standard de concentration protéique connue.

### **Mesure de la production de ROS**

*DCFH-DA.* Le stress oxydatif intracellulaire des cellules SW872 et 3T3L1, après traitement, a été évalué grâce au test utilisant le composé diacétate dichlorofluoresceine (DCFH-DA). Le principe du dosage repose sur la pénétration dans les cellules du DCFH-DA, puis sa conversion en DCFH, réaction catalysée par une enzyme intracellulaire (estérase). Les ROS intracellulaires peuvent alors oxyder le DCFH (non fluorescent) et le convertir en DCF, qui émet une fluorescence à 520 nm après excitation à 485 nm.

En ce qui concerne les cellules SW872, après traitement, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées avec du DCFH-DA (10 µM) pendant 30-45 minutes à 37°C, à l'obscurité. Après lavage, la fluorescence est lue grâce au Fluostar Optima microplate reader (BMG LABTECH)

aux longueurs d'onde d'excitation 485 nm et d'émission 520 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

Concernant les cellules 3T3L1, ces dernières sont placées pendant 24 heures dans du DMEM 5mM de glucose. Après lavage, les cellules sont alors mises en présence de la sonde DCFH-DA (10  $\mu$ M). Ensuite, les cellules sont traitées pendant une heure en présence de BSA-MGO ou de glucose 33 mM. Puis la fluorescence est mesurée comme précédemment décrit.

*Détection de l'anion superoxyde.* Le « MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator » est une sonde fluorescente qui permet la détection de l'anion superoxyde d'origine mitochondriale. Le réactif MitoSOX™ Red pénètre dans les cellules et se concentre préférentiellement dans les mitochondries. Après oxydation par l'anion superoxyde mitochondriale, il émet une fluorescence rouge à 580 nm après excitation à 510 nm.

Pour les expérimentations utilisant la cytométrie de flux, après traitements et lavAGE, les cellules sont décollées avec de la trypsine-EDTA, à 37°C (Invitrogen). L'action de la trypsine est stoppée par ajout de DMEM-10% SVF et la suspension de cellules est collectée dans des tubes Falcon de 15 ml. Après centrifugation (1500 g, 3 minutes), les cellules sont lavées avec du PBS, puis incubées pendant 10 minutes à 37°C avec la sonde MitoSOX (5  $\mu$ M). Après lavage, le culot cellulaire est resuspendu dans du PBS avant l'analyse par cytométrie de flux (BD FACSAria™, Becton Dickinson). Un contrôle positif avec des cellules traitées en présence de 100  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été préparé. L'intensité de la fluorescence a été déterminée sur un nombre minimum de 10 000 événements cellulaires. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

## **Immunohistochimie et Immunofluorescence**

*Détermination de l'expression de RAGE au niveau du tissu adipeux épидидymal (TAE).* L'expression de RAGE a été déterminée sur des sections de 7  $\mu$ m de tissus adipeux de souris db/+ et db/db (n=3) inclus en paraffine. L'expression de RAGE a été analysée en utilisant le kit Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP (K4065, DAKO, Danemark). Les sections de TAE ont été déparaffinées, réhydratées et une étape de démasquage a été réalisée dans un tampon citrate de sodium (0,01M ; pH 6) pendant deux minutes au micro-onde. Les sections sont incubées avec l'anticorps primaire anti-RAGE (1/50, Abiotec, Ref # 251890) dans du

PBS-Tween + 5% de BSA, toute la nuit, à température ambiante. Après lavage, les sections sont incubées en présence de l'anticorps secondaire marqué à l'HRP (« horseradish peroxydase ») pendant 30 minutes, à température ambiante. Les coupes sont ensuite mises en présence du substrat chromogène 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) pendant 10 minutes. La coloration est stoppée avec de l'eau et les noyaux sont ensuite marqués avec du DAPI. Les lames sont ensuite recouvertes avec du milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

*Détermination de la formation d'espèces réactives de l'oxygène par l'utilisation du dihydroéthidium (DHE).* Le réactif DHE possède la propriété de pénétrer dans les cellules. Après oxydation dans le cytosol par l'anion superoxyde, le DHE effectue une translocation dans le noyau des cellules où il s'intercale à l'ADN et émet une fluorescence rouge. Des sections de tissus adipeux de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryotome. Les coupes sont fixées pendant une heure, à température ambiante, en chambre humide. Les sections sont ensuite incubées avec du DHE (1/10000, Sigma Aldrich, Ref : D7008), pendant 30 minutes, à 37°C, à l'obscurité. Après lavage avec du PBS-Triton, les noyaux sont ensuite marqués avec du DAPI. Les lames sont ensuite recouvertes avec du milieu de montage Vectashield.

*Détermination de l'expression du 4-HNE par Immunofluorescence.* L'expression de 4-HNE a été déterminée au niveau de section de tissus adipeux de souris db/+ et db/db (n=3) inclus en paraffine (7µm). Les sections de TAE ont été déparaffinées, réhydratées et une étape de démasquage a été réalisée dans un tampon citrate de sodium (0,01M ; pH6) pendant 30 minutes, à 80°C. Les sections sont incubées avec l'anticorps primaire anti-4HNE (1/200, Abcam, Réf : ab46545) dans du PBS-Tween + 0,5% de BSA, toute la nuit, à température ambiante. Après lavage, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé avec l'HRP (1/200) pendant 2 heures, à l'obscurité. Après lavage, les coupes sont ensuite colorées avec du DAPI. Les lames sont ensuite recouvertes avec du milieu de montage Vectashield.

## **Mesure des activités antioxydantes**



*Superoxyde dismutase (SOD).* La SOD catalyse la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. L'activité de la SOD a été déterminée par la mesure du taux de réduction du cytochrome c, par les radicaux superoxydes et générés par le système xanthine / xanthine oxydase. De sorte que plus l'activité SOD de nos échantillons sera importante, moins la quantité de cytochrome c réduit sera détectée par spectrophotométrie. Les mesures ont été réalisées dans un tampon réactionnel (xanthine oxydase, xanthine (0,5 mM), cytochrome c (0,2 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM), EDTA (2 mM) pH 7,8), à 25 ° C. L'activité de la Mn-SOD a été déterminée dans le même tampon après incubation des échantillons avec du NaCN (1 mM) qui inhibe les activités Cu/Zn-SOD. Les activités ont été mesurées par spectrophotométrie à 560 nm, pendant 1 minute, et calculées en utilisant une courbe d'étalonnage standard de SOD. Les résultats sont exprimés en unités catalytique par mg de protéines.

*Glutathion peroxydase (GPx).* La GPx de par son activité enzymatique permet d'éliminer les hydroperoxydes, en particulier l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'activité de la GPx a été déterminée en utilisant de l'hydroperoxyde de cumène comme substrat. Le taux de glutathion oxydé par l'hydroperoxyde de cumène (4 mM) a été évalué par la mesure de la diminution du taux de NADPH (0,12 mM dans du tampon Tris 50 mM) à 340 nm en présence d'un mélange réactionnelle contenant : du tampon Tris 50 mM, du NaCN 0,65 mM, d'EDTA, de glutathion réduit 4,8 mM, et de la glutathionne réductase 1 U/ml. L'absorbance à 340 nm est mesurée toutes les 5 secondes pendant une minute. Les valeurs des pentes des droites obtenues sont rapportées en unité catalytique arbitraire par  $\mu\text{g}$  de protéines.

*Catalase.* Cette enzyme catalyse la transformation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et oxygène. L'activité de la catalase est déterminée par la mesure spectrophotométrique de la diminution du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 240 nm. Un minimum de 20  $\mu\text{g}$  de protéines a été utilisé pour la mesure de l'activité de la catalase, dans un tampon phosphate 500 mM et contenant 35 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'activité de la catalase a été déterminée en utilisant une courbe étalon de l'enzyme (C1345, Sigma Aldrich) allant de 12,5 à 125 U/ml. Les résultats sont exprimés en unité catalytique par  $\mu\text{g}$  de protéines.

### **Mesure des activités du protéasome**

Les activités chymotrypsine-like, trypsine-like et caspase-like du protéasome sont mesurées à l'aide de peptides fluorescents : Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-MCA à 12,5  $\mu$ M final), N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LSTR-MCA à 12,5 $\mu$ M final) et N-Cbz-Leu-Leu-Glu-bnaphthylamide (LLE-NA à 12,5  $\mu$ M final) préparé dans du tampon tris 25 mM pH7,4. La réaction a été réalisée dans des plaques noires à fond transparent en présence de 20  $\mu$ L de lysat protéique, 25 mM de tampon tris à pH 7,4 et de substrat correspondant. La fluorescence est mesurée pendant 30 minutes à 37°C aux longueurs d'onde d'excitation 355nm et émission 440 nm. Le « background » de fluorescence a été obtenu en mesurant l'activité en présence d'inhibiteur du protéasome, le MG132 (10  $\mu$ M final). Les valeurs d'activités obtenues en présence d'inhibiteur ont été soustraites aux valeurs d'activités sans inhibiteur. Les résultats sont exprimés en activité/minutes/ $\mu$ g de protéines.

### **Mesure de l'activité NADPH oxydase**

L'activité de la NADPH oxydase a été mesurée à partir du protocole modifié d'*Abid et al. 2007* (216). La NADPH oxydase catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène, ce qui produit du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Le principe du dosage repose sur la propriété de la lucigénine à émettre des photons, lors de l'acceptation d'électrons générés par l'activité de la NADPH oxydase. La luminescence émise pourra alors être mesurée grâce à un luminomètre (Glomax-96 luminometer). Un volume de tampon contenant : 250 mM d'HEPES pH 7,4, 120mM de NaCl, 5,9 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O), 11 mM de glucose, 0,5 mM d'EDTA, 100  $\mu$ M de NADH et 5  $\mu$ M de lucigénine, est ajouté à un volume d'échantillons. L'émission de lumière est mesurée sur une période de 20 minutes grâce au luminomètre. Les résultats sont exprimés en unité catalytique arbitraire/ $\mu$ g de protéines et exprimés en pourcentage (%) par rapport au contrôle.

### **Western Blot et Dot Bot**

*Western Blot.* Les protéines (20  $\mu$ g) ont été séparées sur un gel d'électrophorèse à 10-15% d'acrylamide puis transférées sur une membrane PVDF. La membrane est lavée deux fois

dans du TBS-Tween avant la saturation des sites non spécifiques par incubation pendant une heure, à température ambiante, dans du TBS-Tween Lait 5%. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire préparé dans du TBS-Tween lait 2,5%, à 4°C, toute la nuit. Les différents anticorps primaires utilisés sont : LMP2 (sc-28809),  $\beta$ -tubuline (sc-58883), O-GlcNac (sc59624), Pkc $\beta$ 2 (ab32026), I $\kappa$ Ba (SAB4501994), TNF $\alpha$  (SAB4502982), SOD1 (Cell Signaling), SOD2 (ab16956), Bcl2 (Cell Signaling) et  $\beta$ -actin (ab 8227). Après lavage avec du TBS-Tween, les membranes sont mises à incuber avec l'anticorps secondaire, dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire utilisé et couplé à l'HRP pendant une heure à température ambiante. Le signal est détecté grâce au réactif ECL.

*Dot Blot.* La mesure de l'expression du 4-HNE par dot blot a été réalisée à partir d'un protocole adapté de *Masaki Tanito et al.* (62) Les échantillons sont préparés à une concentration de 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Le transfert des échantillons sur la membrane de nitrocellulose utilise un système de « blotting ». Le papier Wattman et les membranes de nitrocellulose sont humidifiés dans l'eau avant d'être placés dans le système de blotting. Une première aspiration est effectuée, avant de déposer les échantillons, pour évacuer l'excédent d'eau. 150  $\mu$ l d'échantillons par puits sont déposés sur le système et l'aspiration est activée afin de transférer les échantillons sur la membrane de nitrocellulose. Après lavage des puits avec du PBS, les membranes sont séchées à l'air libre sur du papier Wattman. Les sites non spécifiques sont saturés, par l'incubation des membranes dans du PBS-Tween 0,05% Lait 5%, pendant une heure à température ambiante. Ensuite, elles sont incubées avec l'anticorps primaire anti-4HNE (Abcam, Réf : ab46545, 1/2000) toute la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées avec du PBS-Tween (3 fois), puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (1/4000), pendant une heure à température ambiante. La révélation a été réalisée en utilisant de l'ECL. La quantification du signal a été effectuée en utilisant le logiciel ImageJ.

*Dot Blot Carbonyle.* Le Dot Blot carbonyle a été adapté d'un protocole de Rodney Levine (52). Après lyse des cellules avec du DMSO, une solution de dérivation (20 mM de DNPH, 0,5% TFA, 92% DMSO) a été ajoutée afin d'obtenir une concentration protéique de 300 ng/ $\mu$ l. 1  $\mu$ l d'échantillon a ensuite été déposé sur une membrane de PVDF sèche pour une coloration des protéines au rouge ponceau. Les échantillons sont ensuite dilués à 60 ng/ $\mu$ l avec la solution de dérivation et déposés sur une seconde membrane PVDF, pour la

détection des protéines carbonylées. Après dépôt des échantillons, la membrane est séchée à l'air libre pendant 15 minutes, puis lavée deux fois à l'acide acétique pour éliminer l'excédent de DNPH. Après le second lavage, la membrane est humidifiée avec 5 ml d'acide acétique et de l'eau est ajouté progressivement jusqu'à recouvrement de la membrane puis remplacé par de l'eau uniquement. La membrane est ensuite bloquée dans un tampon PBS Tween 0,05% BSA 1% toute la nuit, à 4°C. Le lendemain, la membrane est incubée pendant 2 heures avec l'anticorps primaire anti-DNP (1 :2000). La membrane est ensuite lavée trois fois avec du PBS Tween 0,05% puis incubée pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (1 :4000). La révélation a été réalisée en utilisant de l'ECL et la quantification du signal a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ.

## Test ELISA

*IL6 et TNFα.* La détection de la sécrétion de l'IL6 et du TNFα a été réalisée au niveau du broyat de tissus adipeux et au niveau des surnageants de culture des 3T3L1. Les tests ELISA IL6 et TNFα sont réalisés à l'aide du kit eBioscience (Réf 88-7064 pour IL6 et Réf 88-7324 pour TNFα). Les échantillons sont déposés (2 heures à température ambiante) dans des puits de plaques de microtitration tapissés au préalable avec des anticorps spécifiques (4°C, toute la nuit) et dont les sites non spécifiques sont saturés. La plaque est lavée avec du PBS-Tween 0,05%, trois fois. La plaque est ensuite incubée en présence de l'anticorps de détection pendant 1 heure à température ambiante, suivie par trois lavages ainsi qu'une incubation de 30 minutes en présence du complexe Avidin-HRP. La révélation se fait par ajout de TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) et la coloration est stoppée par ajout de HCl 2N. L'absorbance est lue à 450 nm et la concentration est calculée à l'aide d'une courbe étalon allant de 2 à 500 pg/ml pour l'IL6 et allant de 4 à 1000 pg/ml pour TNFα. Les résultats sont exprimés en pg/ml/μg de protéines.

*Carbonyles.* Les échantillons préparés à une concentration protéique de 10 μg/ml sont déposés sur la plaque (100 μl/puits). La plaque a ensuite été mise à 4°C, toute la nuit. Le lendemain, la plaque est lavée avec du PBS est mis en présence de DNPH pour réaliser l'étape de la dérivation. La solution de DNPH stock est préparée dans de la guanidine-HCl 6M à une concentration de 1 mg/ml. La solution est ensuite diluée dans la guanidine-HCl à la concentration de 0,04 mg/ml. 100 μl de DNPH est ajouté par puits et la plaque est mise à

incuber 30 à 45 minutes à 37°C, dans l'obscurité. Pour éliminer l'excès de DNPH, la plaque est lavée 5 fois sous agitation avec un mélange PBS/Ethanol (1 :1, v/v) suivi par deux lavAGE avec du PBS puis les sites non spécifiques sont saturé pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après lavage, l'anticorps primaire anti-DNP dilué au 1/6000 est ajouté, et la plaque est incubée à température ambiante pendant une heure. Après lavage, et l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (1/100 000) est ajouté (100 µl/puits). Après une heure, la révélation est réalisée par ajout de TMB. La réaction est très rapide (1 à 2 minutes), et est stoppée par ajout de HCL 2N. L'absorbance est lue à 450 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage (%) par rapport au contrôle.

### **Dosage des TBARS**

Le dosage des TBARS permet de mesurer la présence de MDA (malondialdehyde), en présence de TBA (acide thiobarbiturique). Brièvement, 200 µl d'échantillon sont mis en présence de 10 µl de BHT (butylated hydroxytoluène), 200 µl de réactif Quintanilla (375 mg de TBA, 20 g de TCA pour un volume final de 100 ml) et de 0,4 µl de FeCl<sub>3</sub> (10 µM final). Le mélange est chauffé pendant 15 minutes à 100°C, puis centrifugé à 5000g pendant 10 minutes. 200 µl du surnageant est ensuite prélevé et l'absorbance est lue à 535 nm. La concentration en MDA est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de MDA de 0 à 20 µM. Les résultats sont exprimés en µM de MDA/µg de protéines.

### **Analyse de l'expression des récepteurs RAGE et CD36 par cytométrie de flux**

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits et traitées comme décrit dans la partie **culture et traitement des cellules SW872**. Après traitement, les cellules sont lavées avec du PBS, puis grattées, délicatement, dans du PBS BSA 1% froid. Après centrifugation (2000 g pendant 3 minutes), le culot est repris avec 50 µl de PBS BSA 1%. 50 µl d'anticorps primaire dilué au 1/25 sont rajoutés à la suspension cellulaire (anti-CD36 couplé FITC (HM2122F) et anti-RAGE (R5278, Sigma)). Un control négatif en absence d'anticorps primaire est réalisé. Après une heure d'incubation à température ambiante, les cellules sont centrifugées et lavées avec du PBS/BSA. Les cellules sont ensuite incubées en présence ou en absence d'anticorps secondaire couplé avec la PE, pendant 30 minutes. L'intensité de la

fluorescence de la FITC et de la PE (phycoerythrin) est analysée par le cytomètre de flux FACSscan (Becton-Dickinson), à une longueur d'onde excitation/émission de 488/525 pour la FITC et 488/575 pour PE. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules exprimant CD36 ou RAGE et exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

### **Real time qPCR**

Les ARN totaux des tissus et cellules sont extraits par une technique utilisant le réactif Trizol (Invitrogen) et adapté de *Chomczynski et Sacchi* (217). Après lyse des échantillons dans le réactif et addition de chloroforme, les ARN totaux retrouvés dans la phase aqueuse, sont précipités par ajout d'isopropanol. Après lavage avec l'éthanol 75%, les ARN sont resuspendus dans de l'eau DEPC (Diethylpyrocarbonate). La concentration des ARNm a été déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. 4 µg d'ARN ont été rétro-transcrits en ADNc grâce à l'utilisation d'amorces aléatoires, d'un mélange de désoxynucléotides et de l'enzyme de transcription inverse « Moloney Murine Leukemia Virus » (MMLV, Invitrogen). Les échantillons sont placés à 37°C pendant 55 minutes, puis à 70°C pour inactiver l'enzyme. L'ADNc généré, a ensuite été amplifié par PCR dans un tampon réactionnel contenant des amorces spécifiques à 10 µM (voir **annexe 2**). La quantification des amplicons générés repose sur la présence de l'agent intercalant fluorescent « SYBR green (Eurogentec) » dans le tampon réactionnel. 40 cycles de PCR, de 15s à 95°C puis 1 min à 60°C, ont été effectués grâce à l'ABI PRISM 7000 thermal cycler (Applied Biosystems). Les résultats de mesure de fluorescence ont été analysés grâce au logiciel ABI PRISM 7000 SDS. Le taux d'induction d'ARN spécifique a été déterminé en utilisant la GAPDH comme référence.

### **Statistiques**

Les statistiques ont été réalisées sur un minimum de trois expériences indépendantes et à l'aide d'un test one-way ANOVA ou d'un test de Student grâce au logiciel PRISM. Les valeurs sont considérées comme significatives si la p-value est au moins inférieure à 0,05.



## **V. Résultats**





# **Etude 1: Impact du stress oxydant induit par une hyperglycémie chronique ou intermittente sur un modèle de cellules adipocytaires, les SW872.**

## **Introduction**

Le diabète et les pathologies qui lui sont associées sont des problèmes majeurs de santé publiques dans le monde. Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique supérieure à 1,26 g/L à jeun. L'hyperglycémie est un facteur clé dans le développement de l'insulino-résistance et est associé avec un stress oxydant impliqué dans les modifications oxydatives des protéines. Non seulement les dommages aigus et répétitifs mais aussi les dommages sur le long terme induit par l'hyperglycémie, peuvent contribuer à la dérégulation du métabolisme cellulaire (218).

Les adipocytes ont une fonction importante dans l'organisme de par leur rôle dans le stockage des lipides mais aussi de par leur fonction endocrine. En effet, les adipocytes sécrètent des molécules appelées adipokines impliquées dans divers processus biologiques tels que l'immunité ou la sensibilité à l'insuline (219–221). Une dérégulation de ces fonctions jouent donc un rôle important dans le développement de maladies métaboliques tel que le diabète de type 2.

Les dommages de type oxydatif, entraînant par exemple la formation de protéines oxydées, au niveau des adipocytes pourraient jouer un rôle crucial dans le dysfonctionnement des adipocytes et donc dans le développement de maladies métaboliques. De plus, un dysfonctionnement des activités du protéasome joueraient un rôle dans l'augmentation des dommages cellulaires (222).

Dans cette première étude nous avons utilisé des cellules SW872 qui constituent une lignée cellulaire d'adipocytes humain comme modèle afin de déterminer si l'hyperglycémie chronique ou l'hyperglycémie intermittente pouvaient avoir un effet délétère sur la lignée cellulaire des adipocytes SW872. Pour cela, la présence de protéines carbonylées a été

déterminée par des techniques de dot blot dirigé contre les groupements carbonyles et confortés par des tests ELISA. De plus, l'expression mais aussi les activités du protéasome ont été analysés. Enfin, nous avons essayé de mettre en évidence la présence de récepteur RAGE et CD36 au niveau des cellules SW872 qui sont des récepteurs pouvant lier HMGB1, une cytokine pro-inflammatoire.





**To cite:** Boyer F, Rondeau P, Bourdon E. Hyperglycemia induces oxidative damage in SW872 cells. *Arch Med Biomed Res.* 2014;1(2):66-78.

#### Publication history

Received: April 23, 2014

Revised: May 15, 2014

Accepted: May 16, 2014

#### Open Access

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 3.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial.

**Correspondence to**  
Emmanuel Bourdon;  
Emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr

## Hyperglycemia induces oxidative damage in SW872 cells

Florence Boyer<sup>1</sup>, Philippe Rondeau<sup>1</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The high level of oxidative stress in obesity-linked type 2 diabetes is associated with elevated formation of advanced glycation end products (AGEs). Given that very little is known about the role of proteasome and AGE receptors (CD36 and RAGE) and ligands (HMGB1) in adipocyte response to hyperglycemia-induced oxidative stress, this study was focused on assessing the impact of either chronic or intermittent hyperglycemia on proteasome expression and activity, RAGE and CD36 expressions and HMGB1 mRNA levels in SW872 cell lines. 15% and 80% increases in ROS production and carbonyl accumulation were observed, respectively, when cells were incubated in hyperglycemic conditions compared to the control. Enhanced immunoproteasome expression was observed by Western blot attesting the inflammatory situation of SW872 cells when incubated in chronic hyperglycemia. Using fluorescent specific substrates, significant enhanced trypsin like activity of the proteasome (+60%) were observed in cells incubated in hyperglycemic conditions. Chronic hyperglycemia leads to cellular protein damages to a greater extent than intermittent hyperglycemia induced. An increase in CD36 and RAGE expressions was shown in SW872 treated in hyperglycemic conditions. Using real time quantitative PCR, enhanced HMGB1 mRNA expressions were evidenced in hyperglycemic-treated SW872 cell line. Our data clearly indicate that hyperglycemia treatments result in an increase in oxidative damage in SW872 cell lines that may affect its functionality. Oxidative stress drives the activation of inflammatory processes through RAGE ligands and receptors that can perturb insulin signalling leading to glucose intolerance and diabetes.

**KEY WORDS:** Diabetes; Oxidative stress; Proteasome; Adipocytes

### INTRODUCTION

Free radicals and reactive oxygen species (ROS) can induce oxidative stress and oxidative damages associated with the progression of age-related diseases<sup>1</sup>. Diabetes, which is characterized by hyperglycemia and insulin resistance, can lead to dramatic complications such as cardiovascular disease, which remains the leading cause of mortality in Western countries<sup>2</sup>. Oxidative stress in diabetes may result from several processes, such as elevated ROS production from glucose autooxidation, glycoxidized proteins and impairment of antioxidant proteins<sup>3</sup>.

The incidence of diabetes is increasing, with a worldwide prevalence estimated to double by 2030, primarily because of sedentary lifestyle and obesity<sup>4</sup>. A strong link between obesity and diabetes is now well established with more than 70

percent of people with diabetes being overweight<sup>5</sup>. Adipocytes are known to express and secrete a variety of active molecules, so-called adipokines, which can regulate many biological processes such as insulin-sensitivity, appetite, immunity and reproduction<sup>6</sup>.

Several underestimated factors at the adipocyte level could be involved in adipose tissue malfunctioning in the diabetes. The first factor to be considered is the proteasome proteolytic complex. Indeed, intracellular protein degradation is an intricately regulated process that maintains protein homeostasis and exerts quality control by degrading damaged or misfolded proteins<sup>7</sup>. In eukaryotic cells, the majority of intracellular proteins are degraded by the ubiquitin-proteasome system<sup>8</sup>. If numerous studies have identified the proteasome as a modulator of oxidative stress in a variety of settings, very little is known about its role in adipose tissue and whether hyperglycemia alters its activity in this tissue<sup>9</sup>.

Secondly, two distinct receptors, namely receptor of advanced glycation endproduct (RAGE) and CD36, a SRB1 type receptor, were identified at the adipocyte level and could be involved in the oxidative stress-induced inflammation<sup>10</sup>. Nonetheless their expressions in SW872 subjected to hyperglycemia have never been investigated before.

Finally, high-mobility group protein B1 (HMGB1) constitutes an alarm, which acts as a signal danger when it binds to RAGE. Human HMGB1 is a single polypeptide chain of 215 amino acids. HMGB1 was initially identified as a nuclear factor but was later discovered to be a fundamental cytokine that mediates the response to infection and injury<sup>11,12</sup>.

In this work, we determined whether either chronic or intermittent hyperglycemia could have deleterious effect on SW872 cell lines, a liposarcoma cell line often used as a human adipocyte cell model<sup>13-18</sup>, particularly since the impact of hyperglycemia on SW872 cells

has never been investigated before. We report the effect of hyperglycemia on proteasome expression and activity, RAGE and CD36 expression and HMGB1 mRNA levels in SW872 treated cell lines.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The substrates Z-Leu-Leu-Arg  $\beta$ -naphthylamide (postglutamyl peptidase-like activity) (C0788-10MG); N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr 7-amido-4-merhylcoumarin (chymotrypsin-like activity) (S-6510); and the substrate Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-merhylcoumarin (trypsin-like activity) and MG132 (Z-leu-leu-leu-Al; C2211-5MG) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The antibodies used in this study were antibodies against  $\beta$ -tubulin (SC-58883) and LMP2 (SC-28809) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). All the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare. For FACS, we used an antibody against CD36 conjugated with FITC (HM2121F, Hycult biotechnology) and a rabbit antibody against RAGE (R5278-100UG, Sigma). The anti-rabbit secondary antibody conjugated with PE (EI-1007) was purchased from Vector.

### Cell culture

Human SW872 cells (ATCC, HTB-92) were used as a model for adipocytes. Cells were grown at 37°C under isobaric conditions (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) in an incubator. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 0,5  $\mu$ g/ml amphotericin B were used to propagate the cells<sup>19</sup>. For SW872 treatments, cells were grown to confluence and then stimulated for 6 hours with glucose.

### Hyperglycemic conditions

In order to mimic *in vivo* conditions of normal fasting glucose and

hyperglycemia, cells were cultured with 5 mM D-glucose or 25 mM D-glucose during 6h, respectively<sup>19</sup>.

The intermittent exposure was used to mimic fluctuations in glucose levels: cells were incubated with 5 mM glucose during 1 h 30, with 25 mM glucose during 1 h 30, then with 5 mM glucose during 1 h 30 and finally with 25 mM glucose during 1 h 30<sup>19</sup>.

#### Cell viability

Cell viability was determined by trypan blue exclusion counting. Briefly, 5 µl of a 0.4% solution of trypan blue in PBS was added to 45 µl of cell suspension for 5 min; cell count results were expressed as the percentage of blue stained cells to the total cell number. After counting in trypan blue, cells were lysed for analysis of the proteasome proteolytic activities.

#### MTT assay

The MTT-assay was conducted to evaluate the effect of hyperglycemia on cell proliferation<sup>20</sup>. The assay is based on cleavage of a yellow tetrazolium salt (MTT) by metabolically active cells, yielding a purple formazan, which can be photometrically quantified. An increase in the number of living cells results in an increase in the total metabolic activity, and thus an increase in color formation. Cells were incubated in the presence of different reagents for 6 hours, 20 µL of MTT dye (5 mg/ml) was added then to each well, followed by 4 h of incubation. After discarding the media, 150 µl of isopropanol was added to each well and plates were agitated in the dark for 30 min to solubilize the resulting dark blue formazan crystals. Plates were read using a microplate reader at a wavelength of 595 nm. A negative control well (medium only; no cells and no reagent) was used as reference to zero the absorbance.

#### Cell lysis

After removing the culture media, cells were washed with PBS and lysed by adding lysis buffer (25mM Tris pH=8.3,

10mM KCl, 1mM EDTA and 1% Triton X-100, 1mM) without protease inhibitor for proteasomal activity measurement. The same lysis buffer with protease inhibitor (0,5X final) was used for Western Blot analyses.

For the dot blot analysis and carbonyl ELISA, a lysis buffer containing pure DMSO plus 0.5 % TFA was used.

#### Determination of ROS production by DCF-DA

Six hours after treatment, cells were washed twice with PBS, and incubated with 10 µM DCF-DA at 37°C. After 30 mins, cells were washed once with PBS, and the fluorescence intensity of the oxidized form of DCF was measured in a microplate-reader at 492 nm (excitation) and 520 nm (emission). Fluorescence values were calculated after background subtraction (using identical conditions without DCF).

#### Proteolytic activity of the proteasome

Chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like proteasome activities were assayed using fluorogenic peptides (from Sigma) Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-MCA at 25 µM), N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LSTR-MCA at 40 µM) and N-Cbz-Leu-Leu-Glu-b-naphthylamide (LLE-NA at 150 µM), respectively<sup>21</sup>. Assays were carried out on approximately 50 µg of cell lysate in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) and the appropriate substrate, which were incubated together at 37°C for 0–30 mins. Aminomethylcoumarin and β-naphthylamine fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 350/440 and 333/410 nm, respectively, using a fluorometric microplate reader (Fluostar - BMG France). Peptidase activities were measured in the absence or presence (20 µM) of the proteasome inhibitor, MG132 (N-Cbz-Leu-Leu-leucinal), and the difference between the two values was attributed to proteasome activity.

**Western Blot analysis**

Total proteins (20 µg) were separated by electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel and then electrotransferred to an immobilon-P membrane (Millipore) and blocked with 1% BSA in PBS buffer containing 0.05% Tween-20. The blocked membrane was incubated in the same buffer containing antibody against LMP2 or antibody against  $\beta$ -tubulin used as loading control. The membranes were washed with PBS buffer containing 0.05% Tween-20 and then incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-goat or anti-mouse IgG as a secondary antibody. The bands were visualized using enhanced chemiluminescence detection reagent.

**Carbonyl ELISA**

Quantification of protein carbonyl was determined by ELISA. The proteins were incubated with a solution containing DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) for 15 minutes. The reaction with the DNPH was stopped with a basic solution. Then, coating of ELISA plate was performed for 3 hours at 37°C. Blocking was performed overnight at 4°C with PBS 1X, 0.1% tween 20 and 1% BSA. For the detection of carbonylated proteins, a rabbit anti-DNP (2,4-dinitrophenol) primary antibody and a secondary HRP-conjugated antibody were used. TMB was used as substrate for the color development. After 15 minutes incubation, the reaction was neutralized with HCl 2N and absorbance was read at 450 nm. Several protein concentrations were used and the slopes of each curve were compared.

**Carbonyl Dot Blot**

After cell lysis by DMSO, derivatizing solution (20mM DNPH, 0.5% TFA, 92% DMSO) was added to give a protein concentration of 300 ng/µl. Each sample was spotted (1µl) on dry immobilon PVDF membrane for protein determination. To deposit the samples, the membrane was placed on a 96-well plate and to provide a guide for spotting sample, a grid from a

pipette tip rack was used. The membranes were then air-dried for 15 minutes. After air-drying, membranes were washed twice in acetic acid for 2 minutes. After removal of the second wash, 5 ml of acetic acid was added to keep the membrane wet, and water was gradually added to cover the membrane. This solution was removed and replaced with water. After 5 minutes incubation, the membrane was ready for proteins or carbonyl determination<sup>22</sup>. For protein determination, one membrane was stained with Ponceau red while the other membrane was blocked in PBS, 0.05% tween 20, 1% BSA buffer overnight at 4°C. Then, the membrane was incubated for 2 hours with a 1:2000 dilution of goat anti-DNP primary antibody. After incubation, the membrane was washed three times with PBS, tween 20, and then incubated with a 1:4000 anti-goat secondary antibody conjugated with HRP for 2 hours. ECL was used for the detection.

To dispose of a negative or a positive control for this test, cells were treated with different concentration of AAPH during 6h. Signal intensity was determined with ImageJ free software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)<sup>23</sup>.

**Flow Cytometer analysis**

Cells were cultured in 6-well plate and treated when confluent. After treatment, cells were washed once in PBS and scraped in PBS/1% BSA buffer. Then, cells were incubated with FITC-conjugated CD36 primary antibody (HM2122F, Hycult biotechnology) or an antibody against RAGE (R5278-100UG, Sigma) or with FITC-conjugated CD36 primary antibody alone or in the absence of antibody. After one-hour incubation, cells were washed once with PBS/BSA. Then, cells were incubated for 30 minutes with antibody conjugated with PE or with no antibody. PE fluorescence intensity was assayed by FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson).



### qPCR analysis

HMGB1 mRNA expression was analyzed by qPCR. Total RNA was extracted from cell lysates by using Trizol reagent (Invitrogen) and resuspended in sterile water. Concentration of mRNA was determined by reading the absorbance at 260 nm. To perform reverse transcription, a dNTP mix at 10 mM each (Promega), Random Hexamer from Biosystem (N18917) and SuperScript II RT (SS II RT) from Invitrogen (P/N 100004925) were used. Then, qPCR from cDNA using SYBR Green I reagent was then performed. HMGB1 primers (Forward: 5' ACC CAG ATG CTT CAG TCA AC 3' and reverse: 5' GGC GAT ACT CAG AGC AGA AG 3') and GAPDH primers (Forward: 5' TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC 3'; Reverse: 5' GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA 3') were used and amplification was performed using ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System.

### Statistics and data analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  SD from at least three experiments performed in triplicates. For the figures reporting RAGE, CD36 and HMGB1 mRNA and protein expression levels, one or two experiments were performed in triplicate. The significance of differences between groups was assessed using Student's t-test for unpaired samples with Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif.). Significance was defined as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## RESULTS

### Chronic hyperglycemia condition or intermittent hyperglycemia condition did not affect cell viability

We first tested whether our hyperglycemic treatment could be considered as a pathophysiological condition with no impact on cell viability. The results obtained by trypan blue staining, showed that prolonged treatment with glucose or intermittent treatment with glucose did not affect SW872 cell line viability. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment induced a 40% decrease in cell viability

(Figure 1A and B). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was used as a positive control. Identical results were obtained using the MTT assay (Figure 1C).

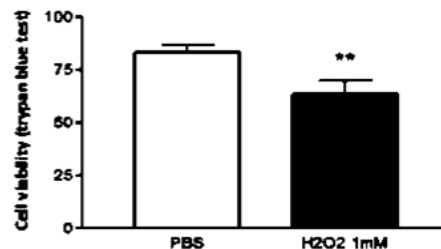


Figure 1A: Cells were treated in the presence or absence of 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell viability was assessed by trypan blue counting. (n=3)

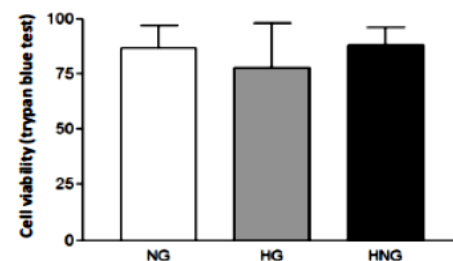


Figure 1B: Cells were treated for 6 hours in normoglycemic condition, chronic hyperglycemic condition or intermittent hyperglycemic condition. We evaluated cell viability by trypan blue counting. Conditions for glucose exposure were: NG: normoglycemic condition (5mM of glucose) for 6 hours; HG: Hyperglycemic condition (25mM of glucose) for 6 hours; HNG: Intermittent hyperglycemic condition (1h30 at 25mM; 1h30 at 5mM; 1h30 at 25mM; 1h30 at 5mM). (n=6)

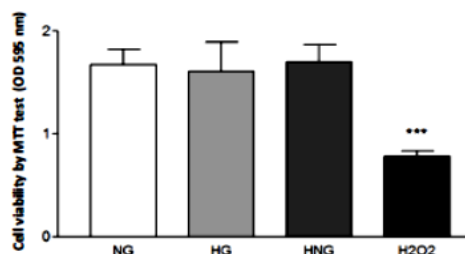


Figure 1C: MTT test. Conditions for glucose exposure were: NG: normoglycemic condition (5mM of glucose) for 6 hours; HG: Hyperglycemic condition (25mM of glucose) for 6 hours; HNG: Intermittent hyperglycemic

condition (1h30 at 25mM; 1h30 at 5mM; 1h30 at 25mM; 1h30 at 5mM). (n=6) Results were analyzed using Student's *t* test for unpaired samples: \*\*\**p* < 0.001 (compared to the control).

### Chronic or intermittent hyperglycemia tends to enhance intracellular ROS production

To study the impact of hyperglycemia on ROS generation in adipocytes, we measured intracellular ROS levels in the treated cells (NG, HG and HNG) using the dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. We observed that chronic hyperglycemia condition or intermittent hyperglycemia seemed to promote ROS generation after 6 hours of treatment compared to normoglycemic condition (Figure 2). A 16 % and 14 % increase in ROS production was observed when cells were incubated in chronic hyperglycemic or intermittent hyperglycemic conditions, respectively, compared to the control.

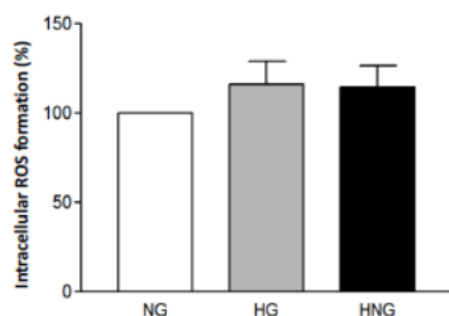


Figure 2: ROS generation was evaluated by the DCF-DA assay. DCF, the oxidation product of the reagent 2, 2'-dichlorofluorescein diacetate, was used as a marker of cellular free radical production. NG: Normoglycemic condition; HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition (n=2)

### Chronic hyperglycemia condition or intermittent hyperglycemia condition increased proteasome expressions and proteasome activities

Proteasome expression was assayed by Western blot analysis (Figure 3A). Antibodies used to performed

proteasome Western blots were specific for the LMP2 subunit. This LMP2 subunit is included to the proteasome complex in inflammatory situation and leads to the formation of the Immunoproteasome<sup>24</sup>.

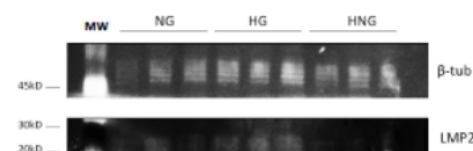


Figure 3A: Proteasome expression was assayed by Western Blot. The detection of  $\beta$ -tubulin and LMP2 proteasome subunit were determined using specific antibodies as described in Material and Method section. NG: Normoglycemic condition; HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition

Noteworthy, immunoproteasome expression was increased in chronic hyperglycemia condition compared to the normoglycemic condition.

Proteasome activity was assayed using fluorescent substrates. The trypsin-like activity of the proteasome was significantly increased in chronic and intermittent hyperglycemia condition compared to control cells in normoglycemic condition (Figure 3B).

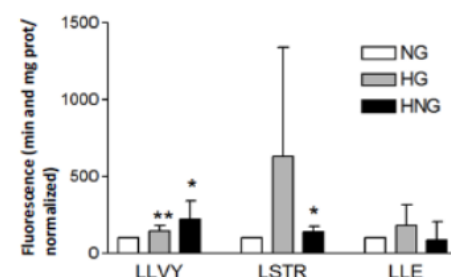


Figure 3B: Proteasome activities were measured using different fluorescent probes. We determined chymotrypsin-like activity, postglutamyl- peptidase-like activity, and trypsin-like activity using N-LLVY-MCA, N-LLE- $\beta$ -naphthylamine, and N-LLR-MCA substrates, respectively. Proteins samples were incubated with or without proteasome inhibitor MG132. The difference between the two fluorescence rates was attributed to the proteasome. NG: Normoglycemic condition;

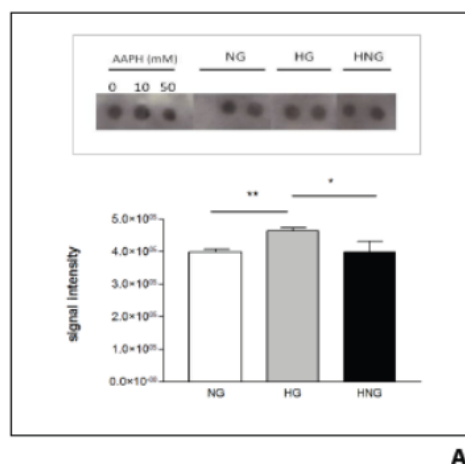
**HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition (n=6)**  
Results were analyzed using Student's *t* test for unpaired samples: \**p* <0.05, \*\**p* <0.01 (compared to the control)

#### Chronic hyperglycemia condition promotes protein oxidation

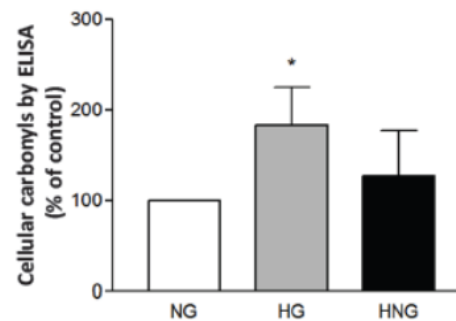
To test if glucose concentration fluctuations may influence protein oxidation in SW872 adipocytes, the cells media was switched between media containing 5 or 25 mM glucose over a period of 6 h. In parallel, we tested the influence of a chronic hyperglycemic treatment on protein oxidation.

Dot blot analysis was used to visualize the rate of protein oxidation. Signal quantification was performed using ImageJ freeware<sup>23</sup>. Chronic hyperglycemia condition significantly increased protein oxidation and intermittent hyperglycemia did not affect the rate of oxidized proteins in comparison with normoglycemic condition (control; **Figure 4A**).

This result was confirmed by carbonyl ELISA showing a significant increase (80%) in carbonylated proteins chronic hyperglycemia-treated cells in comparison with the control (**Figure 4B**). Conversely, intermittent hyperglycemia did not significantly affect the rate of oxidized protein accumulation in comparison with normoglycemic condition (**Figure 4B**).



A

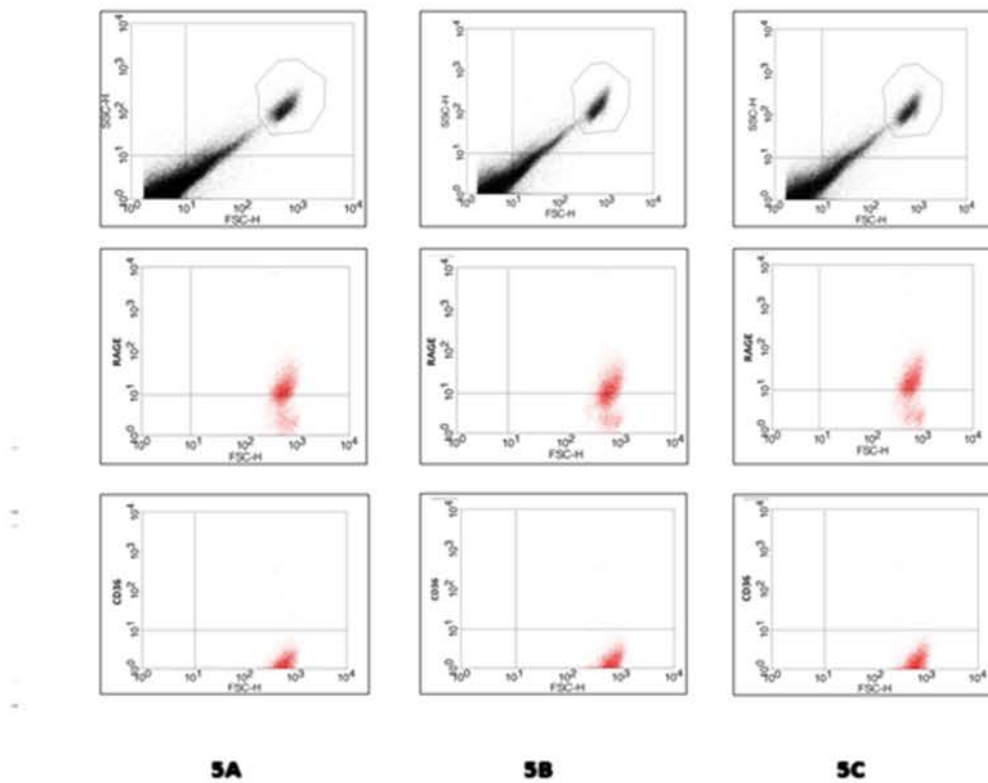


B

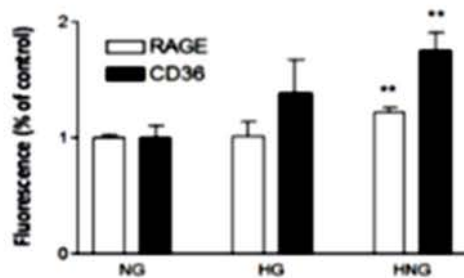
**Figure 4: Oxidized protein accumulation in treated cells was determined by dot blot analysis (A) and ELISA carbonyl (B) NG: Normoglycemic condition; HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition (n=3)** Results were analyzed using Student's *t* test for unpaired samples: \**p* <0.05, \*\**p* <0.01 (compared to the control)

#### CD36 and RAGE expression are enhanced in hyperglycemic condition

To determine whether CD36 and RAGE expressions were modulated by hyperglycemia, we performed a flow cytometer analysis. 80% of cells exhibited RAGE labeling in normoglycemic condition whereas CD36 labeling in normoglycemic condition was less than 15% (**Figure 5A**). In chronic hyperglycemic condition, no significant increase in RAGE and CD36 levels was observed when compared to the control (**Figure 5B, Figure 6**). In intermittent hyperglycemia, RAGE and CD36 expression were significantly increased when compared to normoglycemic condition. High glucose condition increased CD36 and RAGE levels by 1.2-, and 1.7-fold, respectively (**Figure 5C, Figure 6**). Despite their involvement in diabetes-associated cellular disorders, RAGE and CD36 expression at SW872 cell line surface have never been reported before. We showed that RAGE and CD36 expressions are enhanced in SW872 treated in hyperglycemic condition. This result indicates that RAGE and CD36 may play a role in inflammation due to diabetes at the adipocyte level.



**Figure 5: FACS analyses for cellular RAGE and CD36 expressions: CD36 and RAGE expression were determined using Flow cytometer analysis. For the detection of RAGE and CD36, we used FITC-conjugated CD36 primary antibody and an antibody directed against RAGE. (A) normoglycemic condition; (B) chronic hyperglycemia condition and (C) intermittent hyperglycemia condition.**

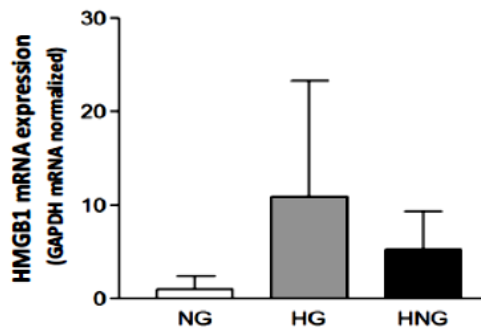


**Figure 6: Expression levels of RAGE and CD36 receptors measured by FACS, were expressed relative to control (normoglycemic condition), normalized to 1. NG: Normoglycemic condition; HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition. Results were analyzed using Student's *t* test for unpaired samples: \*\**p* < 0.01 (compared to the control).**

#### HMGB1 mRNA expression increases in hyperglycemic condition

HMGB1 constitutes one of the ligands for RAGE receptor and is implicated in RAGE-mediated inflammation pathway. To examine whether HMGB1 mRNA transcript was expressed in SW872 cells and modulated by hyperglycemia, cells were maintained either in a chronic hyperglycemia condition for 6 hours or intermittent hyperglycemia condition. Compared to normoglycemic condition, cell treatment in chronic hyperglycemic or intermittent conditions resulted in an increase in HMGB1 mRNA expression (Figure 7).





**Figure 7: HMGB1 mRNA expression was determined by qPCR analysis using SYBR Green method. Amplification and detection was performed using 7700 system software. NG: Normoglycemic condition; HG: Hyperglycemic condition; HNG: Intermittent Hyperglycemic condition (n=2)**

## DISCUSSION

Our present work brings new insight on the impact of hyperglycemia on adipocytes by inducing intracellular ROS formation, carbonylated protein accumulation, impairment in proteasome activity and enhancement in RAGE, CD36 and HMGB1 expressions. All deleterious effects of hyperglycemia are observed in pathophysiological conditions where cellular viability was not affected.

The diabetic pathology is characterized by high ROS production and leads to an important level of oxidative stress. In this pathology, enhanced oxidative stress is linked to hyperglycemia via several processes, such as elevated ROS production from glucose autooxidation, glycoxidized proteins and impairment of antioxidant proteins<sup>3</sup>. In the long term, the accumulation of ROS can cause damages to DNA and oxidation of proteins, which then exert altered functions. These changes can lead to cellular damages. In this study, we observed that high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, used as positive control, did induce a significant reduction (-40%) in cell viability. However no such effect was observed in our experimental conditions suggesting that hyperglycemia treatments did not affect cell viability. Interestingly,

in the presence of pathologically relevant hyperglycemia, a non-significant increase in ROS production was noted. It can be hypothesized that a longer SW872 adipocytes exposure (in this study 6 hours) to hyperglycemia would have induced a significantly higher production of ROS in comparison to cells incubated in normoglycemic condition.

In our experimental conditions, we evidenced significant enhancements in cellular oxidized protein accumulation in adipocytes incubated in hyperglycemic conditions. Again, this result was obtained in conditions, which might be encountered in some uncontrolled pathological diabetes situations. Few studies from our group reported enhanced carbonylated proteins in adipocytes subjected to oxidative stress by AGE treatment<sup>13,23,25</sup>. More recently, we evidenced protective effect of citrus antioxidant on AGE-induced carbonyl accumulation in SW872 cell line<sup>26</sup>.

Enhanced carbonylated protein accumulation was evidenced in adipose tissue biopsies from obese patients<sup>27</sup>. Increased adipose protein carbonylation has been associated with impaired insulin signaling in cell culture models<sup>28,29</sup>.

Beside multiple other functions, the proteasome proteolytic system is responsible for the degradation of misfolded or oxidized proteins. In our experimental conditions, significant increase in LMP2 proteasome subunit was observed by Western blot when cells were incubated in chronic hyperglycemia. This LMP2 subunit is included to the proteasome complex in inflammatory situation and leads to the formation of the immunoproteasome<sup>24</sup>. Hence, SW872 cells when placed in a hyperglycemic environment exhibited an "inflammatory state". This result is in perfect agreement with recent reports from the group of Grune whereby enhanced expression of LMP2 subunit in response to oxidative stress was reported<sup>30-32</sup>.

Though the role of the proteasome at the adipocyte level remains largely

unexplored, the very few examples present in the literature are interesting and suggest targets for drug development. Proteasome appeared to be involved in regulating lipid synthesis in adipocytes and cellular differentiation and therefore could influence the development of obesity<sup>9,33</sup>.

In the present study, significant enhanced trypsin-like activity of the proteasome when cells were incubated in hyperglycemic conditions was shown. This enhanced proteolytic activity could be considered as a defense system triggered by the oxidative stress insult. In our experimental hyperglycemic conditions, proteasome system may be rapidly overwhelmed by oxidative stress and result in carbonylated proteins, which accumulate more importantly than in normoglycemic-treated cells. This enhanced proteasomal activity observed in hyperglycemia-treated adipocyte cells was recently measured in epididymal adipose tissue from transgenic Db/Db diabetic mice (unpublished results).

Oxidative stress in diabetes could originate from AGEs, which constitute a heterogeneous group of well-studied biological substances<sup>10</sup>. Several cascades of reaction can lead to AGEs formation but the initial step is the glycation reaction known as Maillard's reaction. The glycation phenomenon corresponds to the non-enzymatic and non-oxidative covalent attachment of a glucose molecule to a protein<sup>34</sup>. Glycoxidation refers to the radical-mediated oxidation reaction of both free and protein-bound sugars<sup>2</sup>. Amadori rearrangement of the above glycated protein gives rise to advanced glycoxidation (also termed advanced glycation) end products (AGEs)<sup>35</sup>. Interaction of advanced glycated end products with specific receptors in particular RAGE and CD36 induces several cellular phenomena potentially relating to diabetic complications<sup>10</sup>.

This study, for the first time, demonstrates the presence of CD36 and RAGE in SW872 cells. Furthermore, an

increase in CD36 expression in SW872 treated in hyperglycemic conditions is also reported. Data revealing that the binding of AGEs could be mediated by CD36, on adipose cells are quite recent<sup>36,37</sup>. Since then, several studies have reported AGEs deleterious impact on adipocyte physiology<sup>13,38-40</sup>. To our knowledge, our present work is the first report on impact of hyperglycemia on CD36 and RAGE expression and brings new insights on adipocyte role in inflammation progression in the diabetes context.

Furthermore, hyperglycemia enhanced HMGB1 expression by SW872 cell line. HMGB1 represents a ligand for RAGE and acts as a mediator of inflammation. Recent results from our group revealed soluble HMGB1 as a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 cell line contributing to chronic inflammation in fat tissue<sup>41</sup>.

Our present work contains several limitations such as duration of the hyperglycemic treatment of the cells. We used 6-hour treatment and longer hyperglycemia exposure may have induced more drastic effects on cells. Also our results especially concerning CD36, RAGE and HMGB1 expressions require complementary works to gain better insight in the involvement of these receptors at the adipocyte level in hyperglycemic situations. However, our data indicate that hyperglycemic treatments enhance oxidative damage in SW872 cell lines that may affect their functionality. Oxidative stress drives the activation of inflammatory processes, though RAGE ligands and receptors that can perturb insulin signaling, leading to glucose intolerance and diabetes.

Further experiments are warranted for a better understanding of hyperglycemia-induced oxidative stress effect at the adipocyte level.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Structure fédérative

Environnement Biodiversité Santé-FED4126, Université de La Réunion, Plateforme CYROI, 15, avenue René Cassin – BP 7151, 97715 Saint Denis Messag Cedex 09, La Réunion, France

**Acknowledgement:** This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Outre Mer, the Université de La Réunion and by the Conseil régional de La Réunion, France and Europe («Redox project»). FB is recipient of a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion, France and Europe. Authors thank Gunasekaran Manoj Kumar of GEICO for HMBG1 primers supply and for his kind help in qPCR experiments.

## REFERENCES

1. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
2. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.
3. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53.
5. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
6. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444:847-53.
7. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82(2):373-428.
8. Kriegenburg F, Poulsen EG, Koch A, Kruger E, Hartmann-Petersen R. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2012;15(8):2265-99.
9. Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, Fernandez-Kim SO, Bruce-Keller AJ, Szweda LI, et al. Proteasome alterations during adipose differentiation and aging: links to impaired adipocyte differentiation and development of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(9):1727-35.
10. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411-29.
11. Nogueira-Machado JA, Volpe CM, Veloso, CA, Chaves MM. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 2011;15(8):1023-35.
12. Ye X, Chopp M, Liu X, Zacharek A, Cui X, Yan T, et al. Niaspan reduces high-mobility group box 1/receptor for advanced glycation endproducts after stroke in type-1 diabetic rats. *Neuroscience.* 2011;190:339-45.
13. Singh NR, Rondeau P, Hoareau L, Bourdon E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res.* 2007;41(10):1078-88.
14. Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS. Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J Nutr.* 2004;134(11):2935-41.
15. Izem L, Morton RE. Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. *J Biol Chem.* 2007;282(30):21856-65.
16. Roche M, Tarnus E, Rondeau P, Bourdon E. Effects of nutritional antioxidants on AAPH- or AGEs-induced oxidative stress in human SW872 liposarcoma cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(6):635-44.
17. Carmel JF, Tarnus E, Cohn JS, Bourdon E, Davignon J, Bernier L. High expression of apolipoprotein E impairs lipid storage and promotes cell proliferation in human adipocytes. *J Cell Biochem.* 2009;106(4):608-17.
18. Tarnus E, Wassef H, Carmel JF, Rondeau P, Roche M, Davignon J, et al. Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS Lett.* 2009;583(12):2042-8.
19. Koeck T, Willard B, Crabb JW, Kinter M, Stuehr DJ, Aulak KS. Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(7):884-92.

20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
21. Le Pecheur M, Bourdon E, Paly E, Farout L, Friguet B, London J. Oxidized SOD1 alters proteasome activities *in vitro* and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. *FEBS Lett*. 2005;579(17):3613-8.
22. Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Anal Biochem*. 2012;423(2):241-5.
23. Chesne S, Rondeau P, Armenta S, Bourdon E. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie*. 2006;88(10):1467-77.
24. Kriegenburg F, Poulsen EG, Koch A, Kruger E, Hartmann-Petersen R. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2265-99.
25. Singh NR, Rondeau P, Bourdon E. Identification of up-regulated low molecular weight proteins in human adipocytes treated with glycoxidized albumin. *Open Obes J*. 2010;2:110-5.
26. Ramful D, Tarnus E, Rondeau P, Robert Da Silva C, Baborun T, Bourdon E. Citrus Fruit Extracts Reduce Advanced Glycation End Products (AGEs)- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Human Adipocytes. *J Agric Food Chem*. 2010;58(20):11119-29.
27. Frohnert BI, Sinaiko AR, Serrot FJ, Foncea RE, Moran A, Ikramuddin S, et al. Increased adipose protein carbonylation in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(9):1735-41.
28. Demozay D, Mas JC, Rocchi S, Van Obberghen E. FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 2008;57(5):1216-26.
29. Curtis JM, Grimsrud PA, Wright WS, Xu X, Foncea RE, Graham DW, et al. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2010;59(5):1132-42.
30. Grimm S, Ott C, Horlacher M, Weber D, Hohn A, Grune T. Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. *Biochem J*. 2012;448(1):127-39.
31. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T, Davies KJ. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J*. 2010;432(3):585-94.
32. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278(1):311-8.
33. Wing SS. The UPS in diabetes and obesity. *BMC Biochem*. 2008;9 Suppl 1:S6.
34. Cohen MP. Clinical, pathophysiological and structure/function consequences of modification of albumin by Amadori-glucose adducts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5480-5.
35. Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(7):955-69.
36. Horiuchi S, Unno Y, Usui H, Shikata K, Takaki K, Koito W, et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:671-5.
37. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett*. 2003;537(1-3):85-90.
38. Uchida Y, Ohba K, Yoshioka T, Irie K, Muraki T, Maru Y. Cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat white adipocytes via reactive oxygen species-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4075-83.
39. Sakata N, Moh A, Takebayashi S. Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin. *Heart Vessels*. 2002;17(1):22-9.
40. Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, Bernoud-Hubac N, Bouzaïdi-Tiali N, Lagarde M, et al. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(7):882-9.



41. Nativel B, Marimoutou M, Thon-Hon VG, Gunasekaran MK, Andries J, Stanislas G, et al. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE

receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One*. 2013;8(9):e76039.



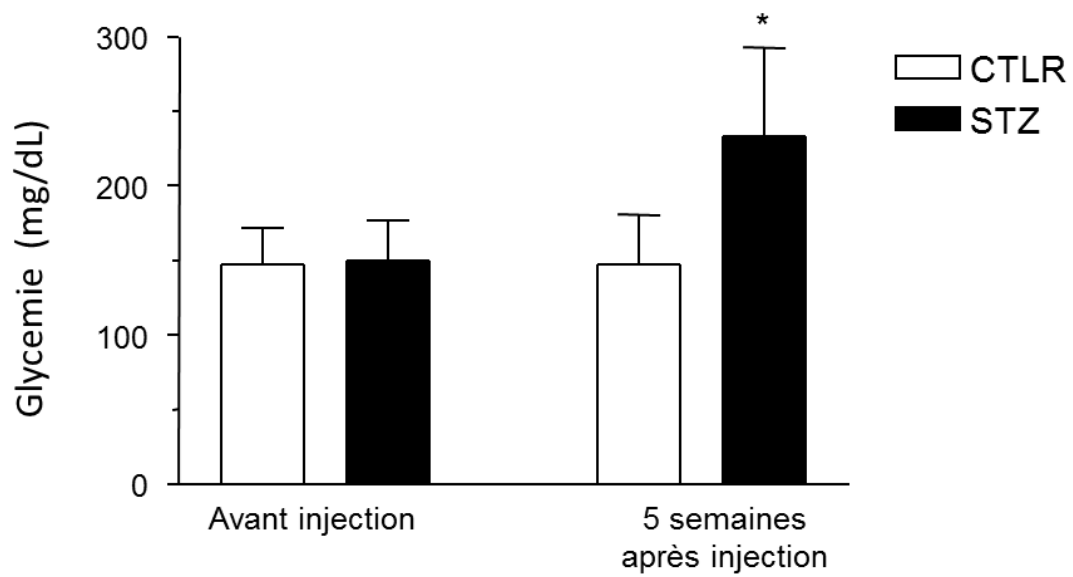
## Discussion

Dans ces travaux, nous avons mis en évidence que l'hyperglycémie entraînait une accumulation de protéines carbonylées, un dysfonctionnement des activités du protéasome, mais aussi une augmentation de l'expression des récepteurs RAGE et CD36. Les récepteurs RAGE et CD36 peuvent fixer différents ligands et entraîner une augmentation de la réponse inflammatoire. L'hyperglycémie induit une augmentation de HMGB1 qui est un médiateur pro-inflammatoire pouvant se lier au récepteur RAGE et stimulant la sécrétion d'IL6.

Bien que les temps de traitement d'hyperglycémie utilisés dans notre étude soit de courte durée, ceux-ci ont donnés lieu à des dommages de type oxydatif au niveau des cellules SW872. Cependant, un travail complémentaire et concernant l'interaction des récepteurs RAGE et CD36 avec HMGB1 serait nécessaire.

Un travail au niveau du tissu adipeux de rats diabétiques a été mené parallèlement à celui sur les cellules SW872. Des rats sont rendus diabétiques grâce à une injection de streptozotocine, ce qui a pour effet de détruire les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Le tissu adipeux blanc, périviscéral et péricardiaque ont ensuite été prélevés et analysés. Cette étude au niveau des rats traités à la streptozotocine a finalement été abandonnée pour différentes raisons : d'une part les rats étaient assez âgés et d'autre part l'hyperglycémie provoquée par les injections de streptozotocine, bien que significative, était assez faible comparée aux rats contrôles (**Figure 17**).

De plus, les rats traités à la streptozotocine représentaient un modèle de diabète de type 1. Par la suite, j'ai choisi de travailler sur le modèle de diabète de type 2 constitué par les souris db/db.



**Figure 17. Mesure de la glycémie chez les rats traités à la streptozotocine.** \*  $p < 0.05$  unpaired t-test (N=4).

## **Etude 2 : Altération des activités du protéasome au niveau du foie de souris db/db**

### **Introduction**

Le diabète peut entraîner l'apparition de pathologies graves telles que les néphropathies, les rétinopathies et les maladies du foie. Le foie est un organe important jouant un rôle dans le métabolisme du glucose. Le stress oxydant, induit par l'hyperglycémie mais aussi par la présence de produits avancés de glycation (AGE), peut affecter le métabolisme hépatique contribuant ainsi au développement de pathologies associées au diabète (116,223).

Les souris db/db représente le modèle d'étude du diabète de type 2 le plus utilisé par les laboratoires de recherche. Au cours de cette étude, une caractérisation des paramètres sanguins des souris db/db a pu être effectuée. Ainsi, la mesure de la glycémie, du taux de HDL et de LDL mais aussi d'AGE a pu être réalisée.

Ce travail sur les foies de souris db/db m'a notamment permis d'étudier l'impact du diabète de type 2 sur les activités du protéasome au niveau hépatique. Le protéasome est connu comme étant l'un des principaux systèmes permettant l'élimination des protéines oxydées, mal repliées ou non fonctionnelles (224,225). C'est pourquoi, un dysfonctionnement au niveau des activités du protéasome peut contribuer à l'apparition de maladie métabolique comme le diabète de type 2. La mesure des activités du protéasome a été effectuée à l'aide de substrat fluorescent au niveau d'homogénats tissulaire hépatique de souris db/+ et db/db.



## Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin

Jessica Patche<sup>a</sup>, Dorothée Girard<sup>a</sup>, Aurélie Catan<sup>a</sup>, Florence Boyer<sup>a</sup>, Anthony Dobi<sup>a</sup>, Cynthia Planesse<sup>a</sup>, Nicolas Diotel<sup>a</sup>, Alexis Guerin-Dubourg<sup>a,b</sup>, Pascal Baret<sup>a</sup>, M. Faadiel Essop<sup>c</sup>, Olivier Meilhac<sup>a,d</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>a</sup>, Philippe Rondeau<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> Inserm UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROi) Université de La Réunion, Plateforme CYROI, Saint Denis de La Réunion, France

<sup>b</sup> Centre Hospitalier Gabriel Martin, Saint-Paul de La Réunion, France

<sup>c</sup> Cardio-Metabolic Research Group (CMRG), Department of Physiological Sciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa

<sup>d</sup> CHU de La Réunion, Centre d'Investigation Clinique, Saint-Denis, F-97400, France

**\*Running title:** *Glycated albumin triggers hepatic oxidative stress*

### \* Corresponding author

DéTROi - Université de la Réunion - CYROI

2, rue Maxime Rivière – BP 80 005 - 97491 Sainte Clotilde Cedex

La Réunion – France - Tel: (+262) 262 93 86 48 - Fax: (+262) 262 93 82 37

[rophil@univ-reunion.fr](mailto:rophil@univ-reunion.fr);

Words: 5963

References: 46

Tables: 2 (online 1 and hardcopy 1)

Figures: 8 (grayscale illustrations: 6, color illustrations: 2)

## Abstract

**Aims:** Increased oxidative stress and advanced glycation end-product (AGE) formation are major contributors to the development of type 2 diabetes. Here plasma proteins e.g. albumin can undergo glycoxidation and play a key role in diabetes onset and related pathologies. However, despite recent progress linking albumin-AGE to increased oxidative stress and downstream effects, its action in metabolic organs such as the liver remains to be elucidated. The current study therefore investigated links between oxidative perturbations and biochemical/structural modifications of plasma albumin, and subsequent downstream effects in transgenic db/db mouse livers and HepG2 cells, respectively. **Results:** Our data reveal increased oxidative stress biomarkers and lipid accumulation in plasma and livers of diabetic mice, together with albumin glycoxidation. Purified mouse albumin modifications resembled those typically found in diabetic patients, i.e. degree of glycation, carbonylation and AGE levels. Receptor for AGE expression and reactive oxygen species production were upregulated in db/db mouse livers, together with impaired proteolytic, antioxidant and mitochondrial respiratory activities. In parallel, acute exposure of HepG2 cells to glycated albumin also elicited intracellular free radical formation. **Innovation:** Although there is evidence that AGE can trigger downstream effects in different cell types, it remains unclear what occurs in liver cells. The current now demonstrates that AGE-modified albumin exerts detrimental effects on liver cells by increasing oxidative stress, and attenuating antioxidant, proteolytic and respiratory chain enzyme activities. **Conclusion:** These data provide novel insights into mechanisms whereby albumin-AGE may be involved in hyperglycemia-induced oxidative damage in hepatocytes and its potential links to diabetes progression.



## Discussion

La mesure de certains paramètres a été effectuée toutes les semaines. Les souris db/db commencent à développer un surpoids au bout de 5 à 6 semaines et une hyperglycémie au bout de 6 semaines seulement. Au bout de 12 semaines d'autres paramètres métaboliques et cliniques ont été évalués. Ainsi, chez les souris db/db, on observe un taux de protéines oxydées et/ou glyquées plus important que chez les souris db/+. Le sérum est composé de 70 à 80 % d'albumine. L'albumine circulante est, par conséquent, une cible privilégiée des phénomènes de glycation et d'oxydation.

Enfin, un taux de HDL plus important a été retrouvé chez les souris db/db comparé au souris db/+ (**Tableau 2**).

Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été déterminé concernant ce modèle de souris diabétiques de type 2.

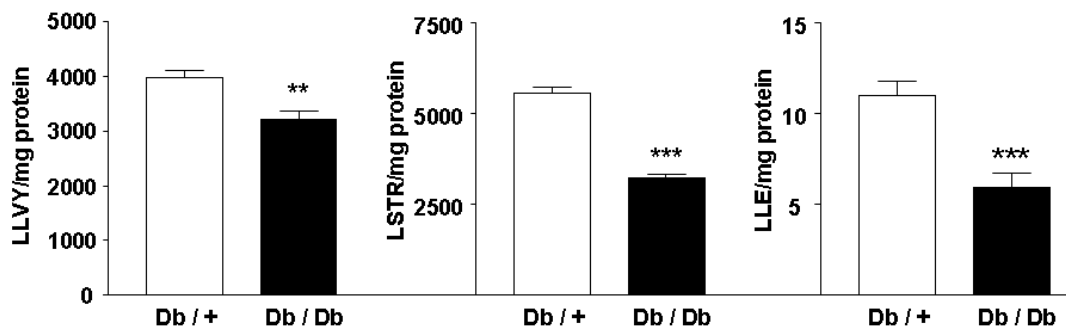
### **Tableau 2. Paramètres cliniques et métaboliques des souris db/+ et db/db à 12 semaines.**

*Poids, TAE, glycémie, HDL, LDL, Fructosamine (N=10). Thiols, Carbonyles, AGE (N=5-6).*

*\*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 et \*P<0.05*

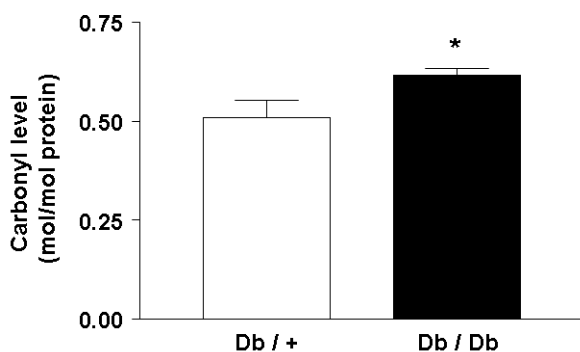
	db/+	db/db
<b>Poids (g)</b>	29.62 ± 1.25	46.72 ± 3.26***
<b>TAE (g)</b>	0.555 ± 0.09	2.430 ± 0.21***
<b>Glycémie (mg/dl)</b>	56.57 ± 13.97	315.14 ± 66.59***
<b>Fructosamine (mmol/L)</b>	311.25 ± 69.55	534.62 ± 100.37***
<b>HDL (mmol/L)</b>	1.70 ± 0.29	2.19 ± 0.41**
<b>LDL (mmol/L)</b>	0.19 ± 0.08	0.26 ± 0.07
<b>Thiols (nmol/g de protéines)</b>	1.06 ± 0.32	0.98 ± 0.14
<b>Carbonyls (nmol/g de protéines)</b>	0.75 ± 0.18	0.99 ± 0.09*
<b>AGE (UA/μg de protéines)</b>	217.80 ± 39.75	310.34 ± 28.72**

Les activités du protéasome, au niveau du foie de souris db/db, sont nettement diminuées comparée aux activités des souris db/+ (**Figure 18**).



**Figure 18. Mesure des activités du protéasome du foie de souris db/+ vs db/db.** LLVY : activité de type chymotrypsine, LSTR : activité de type trypsine, LLE : activité de type caspase. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  un-paired t-test (N=6).

Le protéasome est le système protéolytique principal responsable de la dégradation des protéines oxydées. Un dysfonctionnement des activités du protéasome peut avoir pour conséquence une accumulation de protéines oxydées ou mal repliées.



**Figure 19. Mesure du taux de carbonyl par ELISA du foie de souris db/db.** \*  $P < 0.05$  Un-paired t-test (N=6)

Ici, au niveau du foie de souris db/db, on observe une augmentation du taux de protéines carbonylées comparée aux souris db/+ (**Figure 19**). L'accumulation de protéines oxydées peut être toxique pour les cellules et peut contribuer au dysfonctionnement cellulaire ainsi qu'au développement de maladies métaboliques.

Ces résultats montrent que le stress oxydant, au niveau du foie, peut affecter de manière irréversible les défenses anti-oxydantes. Ce défaut d'action des systèmes antioxydant ou de réparation des protéines non fonctionnelles, peut-être dû à des phénomènes d'oxydation ou de glycation.

Dans la suite de mon travail, je me suis focalisée sur les dommages oxydatifs au niveau du tissu adipeux provenant de ces mêmes souris db/db.



## Etude 3 : Stress oxydant et tissus adipeux

### Introduction

Le diabète est devenu un problème majeur de santé dans le monde. Il a été démontré que les personnes obèses ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ) sont plus susceptibles de développer un diabète au cours de leur vie. Le stress oxydant et les modifications oxydatives des protéines jouent un rôle central dans le développement de maladies métaboliques tel que le diabète associé à l'obésité (226–228).

Parmi les modifications de type oxydatif on peut citer la formation des AGE. Les AGE peuvent se fixer à différents récepteurs et activer certaines voies métaboliques. La fixation des AGE à leurs récepteurs peut notamment contribuer à l'augmentation de l'inflammation mais aussi du stress oxydant (229,230).

Il a été mis en évidence que les cellules adipeuses possédaient des récepteurs RAGE ou CD36, permettant de fixer les AGE et donc de contribuer au dysfonctionnement des adipocytes (151,231). Il existe cependant, à ce jour, très peu d'études concernant l'impact des AGE au niveau des cellules adipeuses. Chez les souris db/db, on observe une nette augmentation du poids du tissu adipeux épididymal avec une hypertrophie des adipocytes.

Dans un premier temps, un état des lieux, donnant lieu à la publication d'une revue, concernant l'impact des AGE sur les adipocytes, a été effectué. Cette étude a mis en évidence que, très peu de recherche concernant l'impact des AGE au niveau du tissu adipeux et des cellules adipeuses, ont à ce jour été réalisées.

Par la suite, on étudiera aussi l'impact de l'hyperglycémie et des AGE, plus précisément l'albumine glyquée, sur un modèle de cellule adipeuse : les cellules pré-adipocytaires 3T3L1.



## Review Article

# Oxidative Stress and Adipocyte Biology: Focus on the Role of AGEs

Florence Boyer,<sup>1</sup> Jennifer Baraka Vidot,<sup>1</sup> Alexis Guerin Dubourg,<sup>1</sup> Philippe Rondeau,<sup>1</sup>  
M. Faadiel Essop,<sup>2</sup> and Emmanuel Bourdon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR D TROU, Inserm U1188 Diabète Ath rothrombose Thérapies Réunion O can Indien, Université de La Réunion,  
Plateforme CYROI, Saint Denis de La Réunion, France

<sup>2</sup>Cardio-Metabolic Research Group (CMRG), Department of Physiological Sciences, Stellenbosch University,  
Stellenbosch, South Africa

Correspondence should be addressed to Emmanuel Bourdon; [emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr](mailto:emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr)

Received 17 December 2014; Accepted 6 March 2015

Academic Editor: Jeannette Vasquez-Vivar

Copyright   2015 Florence Boyer et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Diabetes is a major health problem that is usually associated with obesity, together with hyperglycemia and increased advanced glycation endproducts (AGEs) formation. Elevated AGEs elicit severe downstream consequences via their binding to receptors of AGEs (RAGE). This includes oxidative stress and oxidative modifications of biological compounds together with heightened inflammation. For example, albumin (major circulating protein) undergoes increased glycoxidation with diabetes and may represent an important biomarker for monitoring diabetic pathophysiology. Despite the central role of adipose tissue in many physiologic/pathologic processes, recognition of the effects of greater AGEs formation in this tissue is quite recent within the obesity/diabetes context. This review provides a brief background of AGEs formation and adipose tissue biology and thereafter discusses the impact of AGEs-adipocyte interactions in pathology progression. Novel data are included showing how AGEs (especially glycated albumin) may be involved in hyperglycemia-induced oxidative damage in adipocytes and its potential links to diabetes progression.

## 1. Introduction

Diabetes and associated pathologies are major health problems with an existing high and continuously rising prevalence worldwide. For example, more than 55 million individuals are burdened with this condition in Europe with it being projected to further increase to 64 million by 2030 [1]. Diabetes is a multifaceted disorder that is characterized by various metabolic derangements, with hyperglycemia as a major culprit. It is also associated with severe complications; for example, diabetes doubles the risk of developing cardiovascular diseases (CVD) that currently constitute the leading cause of mortality in developed countries [2]. Poor lifestyle choices are strongly connected to diabetes development, with especially suboptimal dietary intake and the lack of exercise linked to obesity onset. The latter usually includes excessive fat accumulation in adipose tissues, with such persons exhibiting relatively high body mass index

(BMI) values of typically greater than 30 kg/m<sup>2</sup>. However, obesity *per se* does not represent an underlying medical condition but rather associated complications such as insulin resistance, type 2 diabetes, and CVD [3]. For example, obese persons with a BMI equal to 30 kg/m<sup>2</sup> display a tenfold increase in risk for developing obesity-related pathologies compared to normal weight persons [4]. Together these studies demonstrate that the tremendous increase in obesity and associated pathologies (such as diabetes) constitute a significant global burden of disease that requires serious intervention strategies to counter its growing threat. In addition, a greater understanding of underlying mechanisms linking obesity to associated pathologies is essential as it may lead to the development of novel therapeutic interventions.

Oxidative stress, and more specifically oxidative damage to proteins, is increasingly thought to play a central, mechanistic role in this context as it is associated with modifications in the activities of biological compounds and cellular



processes that may be linked to pathological complications. In support, the pathophysiologic perturbations connected with obesity-related diabetes are robustly associated with hyperglycemia-induced oxidative stress [5, 6]. Here oxidative stress may originate from various sources, with the mitochondrion proposed to play a major role as what was previously shown by our laboratory for the heart [7]. Furthermore, our recent data demonstrate that extra-mitochondrial sources such as NADPH oxidases can also generate reactive oxygen species (ROS) in cardiomyoblasts exposed to simulated hyperglycemic conditions [8]. Such oxidative stress is further fueled by excessive ROS production from glucose autooxidation and also the nonenzymatic, covalent attachment of glucose molecules to circulating proteins that results in the formation of glycated proteins and advanced glycation endproducts (AGEs) [9]. Greater AGE availability can in turn lead to downstream consequences, that is, binding to the receptor for AGE (RAGE) on target cells that induces several intracellular phenomena that likely contribute to the onset of diabetic complications (recent review in [10]). Higher systemic glucose levels can therefore lead to modifications of target proteins with severe downstream effects. For example, enhanced glycation of albumin (major protein in circulation) with diabetes significantly impairs its normal antioxidant function, while at the same time it also acquires additional detrimental properties [11, 12].

Despite the pivotal part that adipocytes play in the onset of several physiological/pathological processes, the role of increased AGEs formation in such tissues is not well understood and it is considered a slowly emerging research niche area [13]. For example, the first studies showing the impact of AGE-modified bovine serum albumin (BSA) on adipocytes were only published in 2003 [14, 15]. This minireview will therefore focus on the impact of AGEs-adipocyte interactions in terms of diabetes pathology progression. The background of AGEs formation and adipose tissue biology will initially be reviewed and thereafter the focus will shift to the link between AGEs and adipocytes. We will also include recent data focusing on glycated albumin and its link to hyperglycemia-induced oxidative damage in adipocytes.

## 2. AGEs Formation and Receptors

Several reaction cascades can result in AGEs formation, with the steps leading to glycation known as the Maillard reaction that was discovered by the famous French chemist Louis Camille Maillard during the early 1900s. This results in the nonenzymatic and nonoxidative covalent attachment of glucose molecules to target proteins, lipids, and nucleic acids [16]. Glycooxidation refers to the radical-mediated oxidation reaction of both free and protein-bound sugars [2]. The Amadori rearrangement of glycated proteins gives rise to advanced glycooxidation endproducts (also termed AGEs) [17]. The high variety in such reactions renders AGEs a heterogeneous group of chemically modified proteins [13]. For example, if lysine residues are particularly prone to glycation, the reaction can also affect arginine and cysteine residues

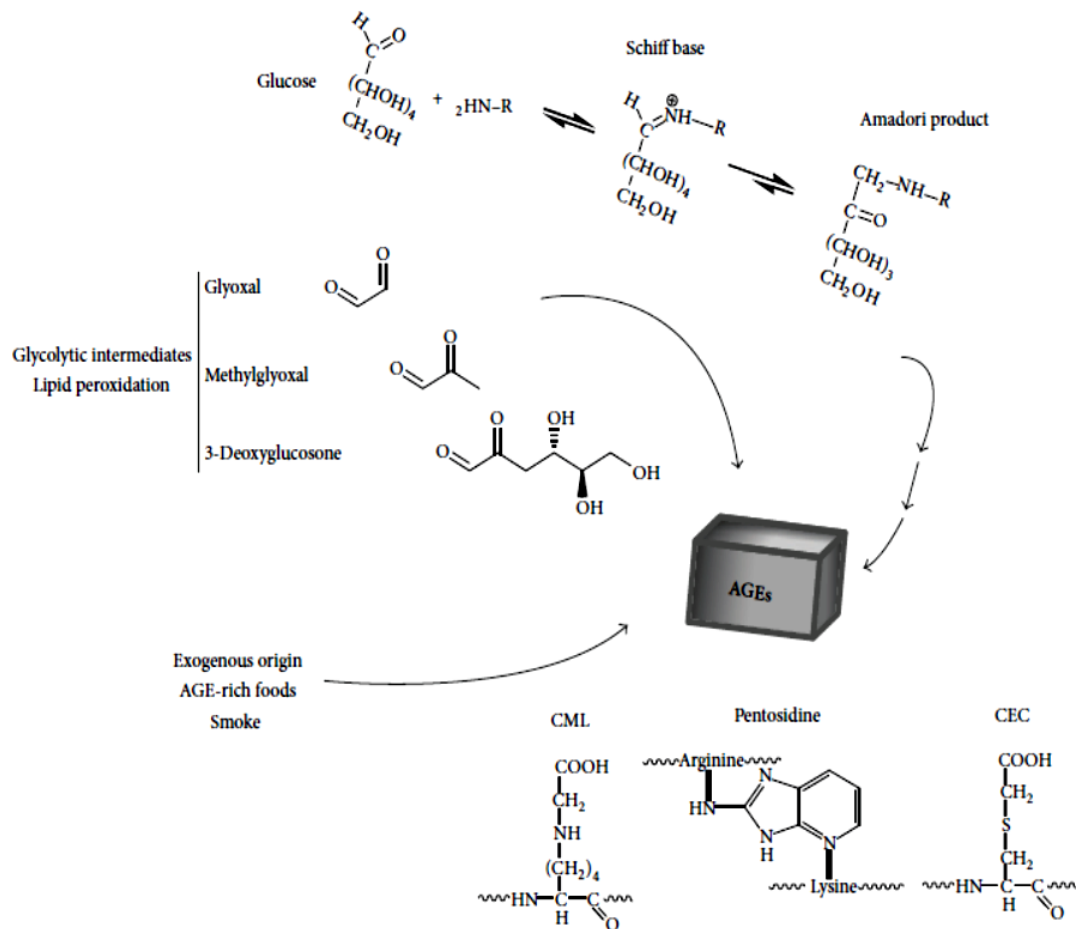
leading to the generation of the major AGEs, that is, N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine (CML), the crosslinker pentosidine, and S-(carboxymethyl)cysteine (CEC) [12] (Figure 1).

AGEs formation can result both from exogenous sources (dietary intake) and also due to high glucose availability that can trigger the Maillard reaction. AGEs were first identified in food processing technology and used to improve its quality in terms of taste, texture, and sensorial properties. However, recent studies by the Vlassara laboratory revealed the importance of dietary-related AGEs in the development of metabolic disorders and uncovered a novel paradigm; that is, AGEs can precede the onset of diabetes mellitus [18]. Interestingly, other exogenous AGEs sources have also been identified; for example, it is found in cigarette smoke and as a result smokers exhibit relatively high systemic levels [25].

What about AGEs formation within the *in vivo* context? Such modifications occur on a much longer time scale compared to exogenously supplied AGEs found in various dietary and other sources. Thus *in vivo* glycation mainly affects circulating proteins with a relatively long half-life such as albumin, the most abundant plasma protein [12]. It is also well established that enhanced albumin glycation with diabetes is associated with the early occurrence of vascular complications, together with functional protein alterations [12, 26–28]. However, AGEs formation and accumulation in diabetic individuals can result from various biochemical reactions, that is, “many roads leading to Rome” [29]. Here it can result from the reaction with highly reactive glucose-derived glycolytic intermediates such as glyoxal, methylglyoxal, or 3-deoxyglucosone that react 7- to 200-fold faster than glucose [19]. Of note, such AGEs are not formed solely from carbohydrate metabolism but can also result from lipid oxidation and degradation [20].

The glycation of plasma proteins leads to several downstream consequences and this is initiated by its binding to cell membrane-specific receptors. The different receptors able to recognize AGEs can be schematically divided into three types depending on the signaling pathways subsequently induced (Figure 2). RAGE represents the most studied receptor and is mainly expressed on vascular, endothelial, and smooth muscle cells and on monocyte/macrophage membranes [10, 30]. The RAGE family also includes the AGE-R complex constituted by AGE-R1 80K-H, AGE-R2 OST-48, AGE-R3 galectin-3, SR-A (macrophage scavenger receptor types I and II), and SR-B (SR-B type I and CD36) [23, 30]. Several physiologic and pathophysiologic roles have been reported for receptors able to bind to AGEs [10]. Most are considered as toxic effects, that is, downstream oxidative stress generation and the initiation of inflammatory cascades such as ROS-related activation of the proinflammatory transcriptional modulator, NF- $\kappa$ B [10]. Conversely, AGE-R1 and R3 compete with RAGE for AGE binding with resultant opposing effects such as the protective role of AGER against ROS formation, oxidative stress, and increasing AGE degradation and urinary excretion [18]. Scavenger receptors are a family of receptors able to recognize oxidized or acetylated low density lipoproteins at macrophage surfaces. Scavenger receptors A and B (CD36 and SR-B, resp.) are involved in the intracellular





**FIGURE 1: Formation of AGEs.** AGEs can have different origins such as rearrangements of Amadori products, the latter arising from the glycation reaction. It can also be formed from glycolytic products with an exogenous origin. The glycation reaction mainly affects lysine, arginine, and cysteine residues leading to the formation of the following major AGEs: N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine (CML), the crosslinker pentosidine, and S-(carboxymethyl)cysteine (CEC) (adapted from [10, 12, 13, 18–22]).

accumulation of cholesterol and the formation of foam cells from macrophages in the early state of atherosclerosis [31].

As discussed in this section, AGEs have different origins and several receptors play crucial roles in mediating their downstream intracellular effects. In this regard several studies focused on the effects of AGEs on vascular cells and also circulating cells such as monocytes or circulation-derived cells. However, despite the important role of adipocytes in the etiology of diabetes, little is known about the effect of AGEs on such cells. Thus in the following sections an overview of adipose tissue biology and the impact of AGEs on adipocytes will be discussed.

### 3. Overview of Adipose Tissue Biology

Obesity is defined as a condition characterized by excessive fat accumulation and storage [32]. Hence, with caloric abundance, fat is stored as triglycerides (TG) in adipocytes within adipose depots. However, fat stores can also be utilized during times of caloric debt to provide energy substrates by

the release of nonesterified fatty acids (NEFA) into circulation [33]. With obesity there is a higher risk for the onset of cardiometabolic diseases and here increased adiposity (especially visceral adiposity) is linked with a greater risk for insulin resistance/type 2 diabetes [34–36]. Although the link(s) between obesity, insulin resistance, and the development of type 2 diabetes is still not fully elucidated [33], several studies show that the dysregulation of adipocyte function is a crucial role player associated with diabetes pathology progression. It is therefore not surprising that numerous investigations are focusing on this problem in order to derive novel therapies that target adipocyte dysregulation within the diabetic milieu [37–39].

The underlying biology of adipose tissue is far more complex than the original concept of its sole function being that of a fat storage depot [40, 41]. In addition to TG storage and NEFA release into circulation, adipocytes express and secrete a variety of active biomolecules or “adipokines” that regulate many physiologic processes such as insulin sensitivity, appetite, immunity, and reproduction [42, 43].

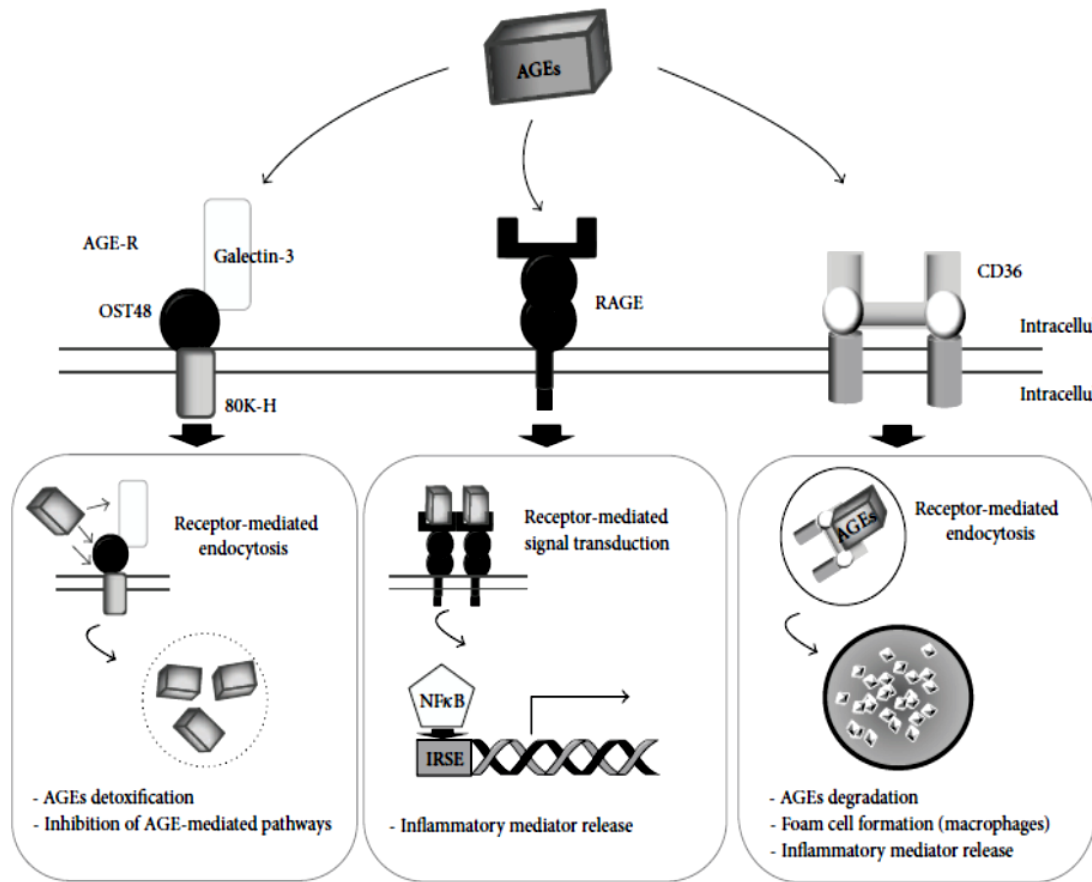


FIGURE 2: *Different types of AGEs receptors.* Three major AGEs-receptor pathways are represented: the AGE-R complex constituted by (a) AGE-R1 80K-H, AGE-R2 OST-48, and AGE-R3 galectin-3, (b) RAGE, and (c) CD36 that belongs to SR-B (macrophage scavenger receptor type B) (adapted from [10, 12, 23, 24]).

Although various processes are implicated in the development of insulin resistance in adipocytes, inflammation and oxidative stress emerge as robust causative factors in this instance [6, 34, 44–46]. In support, a growing number of publications highlight the role of inflammation and oxidative stress and its impact on adipocyte disorders; for example, recent work found increased NFκB-mediated cytokine release from adipocytes isolated from obese individuals [47]. Growth hormone administration also improved glucose intolerance in obese mice presumably by decreasing adipose mass, oxidative stress, and chronic inflammation in visceral fat stores [48]. Moreover, glutathionylated lipid aldehydes, identified as products of adipocyte oxidative stress, result in the activation of macrophage inflammation [49], while an antioxidant molecule attenuated hypoxia-induced oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes [50].

Among the cytokines originating from adipocytes, secretion of the S100 calcium binding protein B, a RAGE ligand, was recently shown to be enhanced in 3T3 L1 cells incubated under inflammatory conditions and triggered macrophage activation through RAGE [51].

Together these studies demonstrate that oxidative stress and inflammation are crucial pathophysiologic mediators that contribute to adipocyte dysregulation and the onset of various cardiometabolic complications.

Most studies implicating oxidative stress and inflammation in adipocyte pathophysiology employed *in vitro*-based methodologies with cells exposed to various stressors such as hypoxia, lipopolysaccharides, hydrogen peroxide, and hyperglycemic treatments [52–55]. Thus limited studies have examined the role of AGEs *per se* in adipocytes, with the detrimental effects of AGEs generally investigated in vascular cells and also circulating cells such as macrophages. The following section will therefore focus on recent, novel data regarding the impact of circulating AGEs on adipocytes.

#### 4. AGEs Adipocyte Interactions and the Onset of Pathologies

As discussed earlier, the effects of AGEs on adipocyte function are limited; for example, a PubMed search with the terms “AGEs adipocytes glycation” retrieved only 19 references. What then is known about the effects of AGEs on

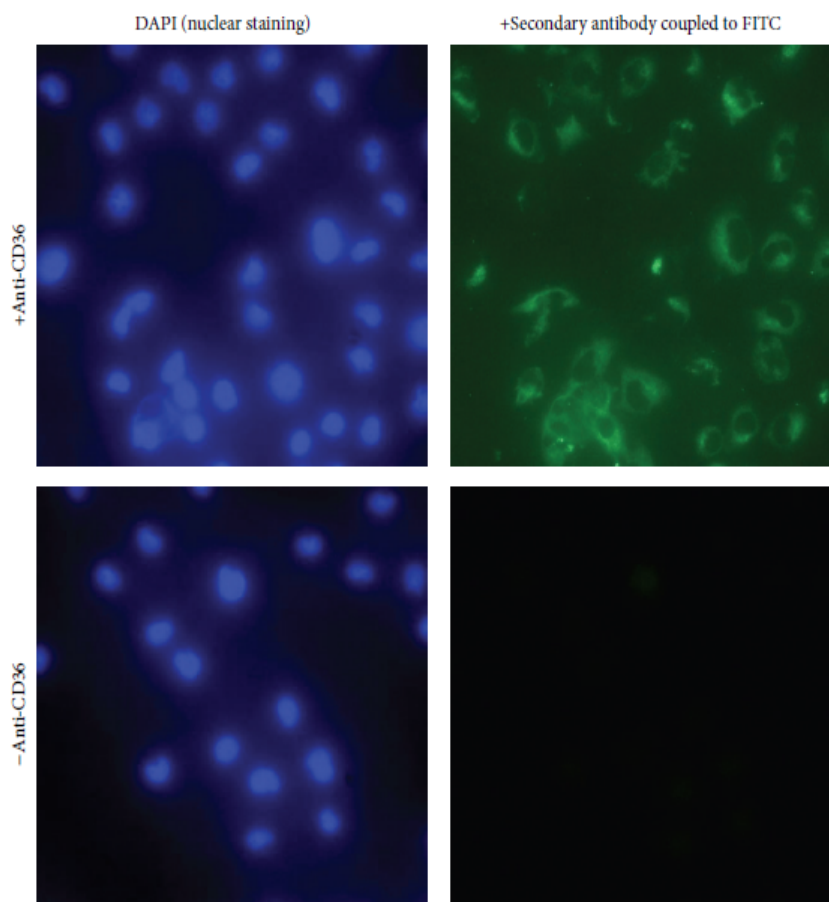


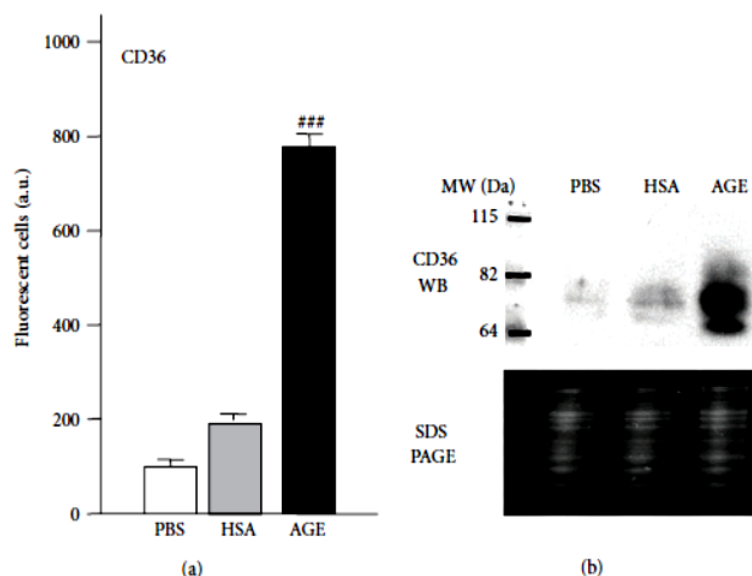
FIGURE 3: *Adipocyte cell line expresses CD36 receptor.* SW872 adipocytes were cultured on 12 mm diameter poly(L-lysine) coverslips until 80% confluency. Cells were fixed in diluted *para*formaldehyde solution (4% v/v in PBS) at room temperature for 20 min and stained successively with a primary human CD36 antibody (1:50 in 1% PBS/BSA) for one hr, followed by incubation with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (1:1,000) for 1 hr and with DAPI solution (1:1,000) for 10 min (for staining of the nucleus). Cells were washed 3x in 1% PBS/BSA between each step of different incubation periods. Cells were imaged using a Nikon eclipse microscope and NIS-Element software (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). \*\*\* $P < 0.001$  (vs. HSA) by Student's unpaired  $t$  test ( $n = 3$ ).

adipocytes? Studies done thus far have identified the major downstream effects as a heightened inflammatory response as well as the generation of intracellular oxidative stress. For example, a recent study showed that AGEs augmented the expression of the prothrombotic/inflammatory regulator, plasminogen activator inhibitor-1, in rat white adipocytes, by a ROS-dependent pathway [56]. Moreover, glycated BSA increased the adipogenic potential of senescent preadipocytes (*in vitro* and *ex vivo*) via the AGEs-RAGE axis together with an impairment of p53 function [57]. Here this occurs by direct binding of RAGE to cytosolic p53 together with the AGEs-RAGE suppression of p53 transcript levels. This in turn enhances the adipogenic potential of preadipocytes, with detrimental long-term effects. Recent experiments performed in our laboratory demonstrated that glycated albumin exposure induced oxidative stress in primary human adipocytes thereby leading to the accumulation of oxidized proteins [58, 59]. A proteomic-based approach allowed us to also determine preferential protein carbonylation targets

in human mature adipocytes treated with glycated versus native albumin [59]. Our studies also revealed greater insights into some of the underlying mechanisms as AGEs-treated adipocytes displayed decreased ubiquitin proteasomal system (UPS) activities and were therefore unable to clear damaged proteins. These data therefore suggest that the origin of accumulated oxidized proteins in AGEs-treated adipocytes likely stems from increased intracellular ROS production together with an impaired UPS [59, 60].

What about the receptors for AGE found on adipocyte membranes? Kuniyasu et al. (2003) were the first to discover the presence of CD36 on mouse adipocyte (3T3 L1 cell lines) cell membranes and on human adipocytes from primary cultures that were able to bind and facilitate AGEs endocytosis and degradation [15]. Two years later the same group identified a pathological role for CD36 in AGE binding in adipocytes, that is, resulting in decreased *in vivo* leptin expression and attenuated insulin sensitivity [61, 62]. In addition, adipocytes exposed to AGEs exhibited





**FIGURE 4: Glycated albumin induces CD36 expression in SW872 adipocytes.** (a) SW872 adipocytes were incubated for 24 hr in the absence (PBS) or the presence of 50  $\mu$ M native human serum albumin (HSA) or AGEs constituted by methylglyoxal- (MGO) modified HSA. The relative quantification (% of fluorescent cells versus control PBS) of CD36 receptors was determined by employing a Becton Dickinson FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) after staining with a primary human CD36 antibody (1:50) for 1 hr, followed by incubation with the secondary Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit (1:100) and PE-conjugated anti-mouse antibodies (1:100) for an additional hour. Cells were washed with a 1% PBS/BSA blocking buffer between each incubation step. (b) For the CD36 Western blot, 20  $\mu$ g proteins were isolated from SW872 cell lysates (with different treatments as indicated), separated by SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using a liquid transfer system. Membranes were soaked overnight with blocking buffer (PBS/0.1% Tween/1% BSA) and subsequently incubated in blocking buffer with a primary human CD36 antibody (1:200) for 2 hr, followed by incubation with a secondary HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (1:2,000). Membranes were washed with a blocking buffer (0.1% PBS/1% Tween) between different incubation steps. Protein bands were detected by standard ECL methods (Amersham Biosciences, Amersham, UK) and visualized with a Kodak 2000R Image station (Eastman Kodak, Rochester, NY), and routine densitometric analysis was performed for quantification.

diminished adiponectin expression (usually associated with insulin resistance) [63]. AGEs exposure also caused impaired functionality of adiponectin and this may further contribute to the development of insulin resistance [64, 65].

The SW872 cell line has only recently been employed as an adipocyte cell model [59, 66–68] and has the advantages of a human origin and also does not require any incubation cocktails to differentiate it into mature adipocytes [66]. We therefore initiated studies using this cell line and found elevated oxidative stress and protein damage in AGEs-treated SW872 adipocytes. Such damaging effects could be blunted with the co-treatment of nutritional antioxidants thereby further implicating oxidative stress in this process [60, 69, 70]. Unpublished findings from our group also demonstrate, for the first time as far as we are aware, that CD36 is expressed in the SW872 cell line (Figure 3). Furthermore, fluorescence-activated cell sorting (FACS) and Western blot data show increased CD36 expression in SW872 adipocytes exposed to glycated albumin purified from diabetic persons (Figure 4). However, as there are no data regarding CD36 expression in adipocytes within the diabetic context, further research is needed. This is currently being pursued by our laboratory in order to assess the correlation between AGEs levels and

CD36 expression in adipose tissues isolated from transgenic diabetic mice (Db/Db strain).

## 5. Conclusions

Enhanced AGEs formation and the subsequent tissue and cellular oxidative damage, together with inflammation, are now well established in pathophysiologic disorder progression. Increasing evidence shows that AGEs accumulation in adipose tissue may contribute to obesity-associated insulin resistance. However, the precise nature and mechanisms of AGEs impact on the adipocyte's function are only now slowly emerging and remain poorly understood. The picture is also more complex than what was covered in this minireview, focusing only on the role of circulating AGEs versus intracellular AGEs in adipocytes. Moreover, the human body's defense mechanisms to counter the overproduction of AGEs were not discussed in this paper. This field is a "hot topic" and here dysregulation of the glyoxylase system, constituted by glyoxylase-I (GLO1) and glyoxylase II (GLO2), is emerging as important contributors to higher AGEs levels [13]. For example, a recent study established that GLO1 overexpression attenuated AGEs and diminished oxidative stress [71]. Thus

further research is required to gain greater insights into the precise nature of the AGEs-RAGE axis in adipocytes and its relevance within the diabetic milieu, with the focus also on extra- and intracellular AGEs availability and the glyoxylase defense system. Such novel insights may in turn unlock novel pharmaceutical and/or nutritional strategic developments that should help blunt obesity-related insulin resistance progression.

### List of Abbreviations

AGE: Advanced glycation endproduct  
 BMI: Body mass index  
 CEC: Carboxymethyl-cysteine  
 CML: Carboxymethyl-lysine  
 CVD: Cardiovascular diseases  
 FACS: Fluorescence-activated cell sorting  
 GLO: Glyoxylase  
 NEFA: Nonesterified fatty acids  
 RAGE: Receptor for AGE  
 ROS: Reactive oxygen species  
 TG: Triglycerides.

### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Outre Mer, the Université de La Réunion, and by the Conseil Régional de La Réunion, France and Europe («Redox project»). Florence Boyer and Jennifer Baraka Vidot are recipients of a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion, France and Europe.

### References

- [1] D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, and J. Shaw, "IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 94, no. 3, pp. 311–321, 2011.
- [2] S. E. Shoelson, J. Lee, and A. B. Goldfine, "Inflammation and insulin resistance," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 7, pp. 1793–1801, 2006.
- [3] P. Trayhurn, "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity," *Physiological Reviews*, vol. 93, no. 1, pp. 1–21, 2013.
- [4] P. G. Kopelman, "Obesity as a medical problem," *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 635–643, 2000.
- [5] J.-Y. Youn, K. L. Siu, H. E. Lob, H. Itani, D. G. Harrison, and H. Cai, "Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome," *Diabetes*, vol. 63, no. 7, pp. 2344–2355, 2014.
- [6] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro et al., "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 12, pp. 1752–1761, 2004.
- [7] R. F. Mapanga, D. Joseph, B. Symington et al., "Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart," *Acta Physiologica (Oxf)*, vol. 210, no. 3, pp. 546–564, 2014.
- [8] D. Joseph, C. Kimar, B. Symington, R. Milne, and M. F. Essop, "The detrimental effects of acute hyperglycemia on myocardial glucose uptake," *Life Sciences*, vol. 105, no. 1–2, pp. 31–42, 2014.
- [9] F. Giacco and M. Brownlee, "Oxidative stress and diabetic complications," *Circulation Research*, vol. 107, no. 9, pp. 1058–1070, 2010.
- [10] C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, A. Navarrete Santos, T. Grune, and A. Simm, "Role of advanced glycation end products in cellular signaling," *Redox Biology*, vol. 2, no. 1, pp. 411–429, 2014.
- [11] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon, "The antioxidant properties of serum albumin," *FEBS Letters*, vol. 582, no. 13, pp. 1783–1787, 2008.
- [12] P. Rondeau and E. Bourdon, "The glycation of albumin: structural and functional impacts," *Biochimie*, vol. 93, no. 4, pp. 645–658, 2011.
- [13] K. H. Gaens, C. D. Stehouwer, and C. G. Schalkwijk, "Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 24, no. 1, pp. 4–11, 2013.
- [14] S. Horiuchi, Y. Sakamoto, and M. Sakai, "Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins," *Amino Acids*, vol. 25, no. 3–4, pp. 283–292, 2003.
- [15] A. Kuniyasu, N. Ohgami, S. Hayashi, A. Miyazaki, S. Horiuchi, and H. Nakayama, "CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes," *FEBS Letters*, vol. 537, no. 1–3, pp. 85–90, 2003.
- [16] M. P. Cohen, "Clinical, pathophysiological and structure/function consequences of modification of albumin by Amadori-glucose adducts," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1830, no. 12, pp. 5480–5485, 2013.
- [17] S. Pennathur and J. W. Heinecke, "Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 9, no. 7, pp. 955–969, 2007.
- [18] H. Vlassara and G. E. Striker, "AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 7, no. 9, pp. 526–539, 2011.
- [19] N. B. Ruderman, J. R. Williamson, and M. Brownlee, "Glucose and diabetic vascular disease," *The FASEB Journal*, vol. 6, no. 11, pp. 2905–2914, 1992.
- [20] A. Stirban, T. Gawlowski, and M. Roden, "Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms," *Molecular Metabolism*, vol. 3, no. 2, pp. 94–108, 2014.
- [21] S. Radjei, B. Friguet, C. Nizard, and I. Petropoulos, "Prevention of dicarbonyl-mediated advanced glycation by glyoxalases: implication in skin aging," *Biochemical Society Transactions*, vol. 42, no. 2, pp. 518–522, 2014.
- [22] P. J. Thornalley, A. Langborg, and H. S. Minhas, "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose," *Biochemical Journal*, vol. 344, part 1, pp. 109–116, 1999.
- [23] N. Ohgami, R. Nagai, M. Ikemoto et al., "CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 947, pp. 350–355, 2001.



- [24] P. J. Thornalley, "Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 44, no. 7, pp. 1013–1023, 1998.
- [25] C. Cerami, H. Founds, I. Nicholl et al., "Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 25, pp. 13915–13920, 1997.
- [26] A. Guerin-Dubourg, A. Catan, E. Bourdon, and P. Rondeau, "Structural modifications of human albumin in diabetes," *Diabetes and Metabolism*, vol. 38, no. 2, pp. 171–178, 2012.
- [27] J. Baraka-Vidot, A. Guerin-Dubourg, F. Dubois, B. Payet, E. Bourdon, and P. Rondeau, "New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1830, no. 6, pp. 3532–3541, 2013.
- [28] J. Baraka-Vidot, A. Guerin-Dubourg, E. Bourdon, and P. Rondeau, "Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin," *Biochimie*, vol. 94, no. 9, pp. 1960–1967, 2012.
- [29] N. C. Chillelli, S. Burlina, and A. Lapolla, "AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a 'glycoxidation-centric' point of view," *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, vol. 23, no. 10, pp. 913–919, 2013.
- [30] Y. Miki, H. Dambara, Y. Tachibana, K. Hirano, M. Konishi, and M. Beppu, "Macrophage recognition of toxic advanced glycosylation end products through the macrophage surface-receptor nucleolin," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 37, no. 4, pp. 588–596, 2014.
- [31] M. Freeman, Y. Ekkel, L. Rohrer et al., "Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 11, pp. 4931–4935, 1991.
- [32] "obesity," in *Merriam Webster Dictionary*, 2014, <http://www.merriam-webster.com/dictionary/obesity>.
- [33] M. Lafontan, "Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, pp. 119–146, 2005.
- [34] G. S. Hotamisligil, "Inflammation and metabolic disorders," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 860–867, 2006.
- [35] A. P. Rocchini, "Childhood obesity and a diabetes epidemic," *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, no. 11, pp. 854–855, 2002.
- [36] B. Balkau, J. E. Deanfield, J.-P. Després et al., "International day for the evaluation of abdominal obesity (IDEA): A study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168 000 primary care patients in 63 countries," *Circulation*, vol. 116, no. 17, pp. 1942–1951, 2007.
- [37] A. B. Mayernik, R. S. Hundal, S. Dufour et al., "The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 51, no. 3, pp. 797–802, 2002.
- [38] R. Rahimi, S. Nikfar, B. Larjani, and M. Abdollahi, "A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 59, no. 7, pp. 365–373, 2005.
- [39] P. Arner, "The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 14, no. 3, pp. 137–145, 2003.
- [40] D. Thompson, F. Karpe, M. Lafontan, and K. Frayn, "Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology," *Physiological Reviews*, vol. 92, no. 1, pp. 157–191, 2012.
- [41] E. Oliveros, V. K. Somers, O. Sochor, K. Goel, and F. Lopez-Jimenez, "The concept of normal weight obesity," *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 56, no. 4, pp. 426–433, 2014.
- [42] M. Lafontan, "Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways," *The American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 302, no. 2, pp. C327–C359, 2012.
- [43] M. Lafontan, "Adipose tissue and adipocyte dysregulation," *Diabetes and Metabolism*, vol. 40, no. 1, pp. 16–28, 2014.
- [44] K. E. Wellen and G. S. Hotamisligil, "Inflammation, stress, and diabetes," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1111–1119, 2005.
- [45] N. Hosogai, A. Fukuhara, K. Oshima et al., "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation," *Diabetes*, vol. 56, no. 4, pp. 901–911, 2007.
- [46] M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil, "Thematic review series: adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease," *Journal of Lipid Research*, vol. 48, no. 9, pp. 1905–1914, 2007.
- [47] F. Tourniaire, B. Romier-Crouzet, J. H. Lee et al., "Chemokine expression in inflamed adipose tissue is mainly mediated by NF- $\kappa$ B," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e66515, 2013.
- [48] M. Fukushima, Y. Okamoto, H. Katsumata et al., "Growth hormone ameliorates adipose dysfunction during oxidative stress and inflammation and improves glucose tolerance in obese mice," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 46, no. 09, pp. 656–662, 2014.
- [49] B. I. Frohnert, E. K. Long, W. S. Hahn, and D. A. Bernlohr, "Glutathionylated lipid aldehydes are products of adipocyte oxidative stress and activators of macrophage inflammation," *Diabetes*, vol. 63, no. 1, pp. 89–100, 2014.
- [50] A. Priyanka, V. M. Nisha, S. S. Anusree, and K. G. Raghu, "Bilobalide attenuates hypoxia induced oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunctions in 3T3-L1 adipocytes via its antioxidant potential," *Free Radical Research*, vol. 48, no. 10, pp. 1206–1217, 2014.
- [51] A. Fujiya, H. Nagasaki, Y. Seino et al., "The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages," *Obesity*, vol. 22, no. 2, pp. 371–379, 2014.
- [52] A. Priyanka, S. S. Anusree, V. M. Nisha, and K. G. Raghu, "Curcumin improves hypoxia induced dysfunctions in 3T3-L1 adipocytes by protecting mitochondria and down regulating inflammation," *BioFactors*, vol. 40, no. 5, pp. 513–523, 2014.
- [53] P. Baret, A. Septembre-Malaterre, M. Rigoulet et al., "Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 45, no. 1, pp. 167–174, 2013.
- [54] F. S. Lira, J. C. Rosa, G. D. Pimentel et al., "Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- $\kappa$ B pathway in 3T3-L1 adipocytes," *Cytokine*, vol. 57, no. 1, pp. 98–106, 2012.
- [55] Y. Lin, A. H. Berg, P. Iyengar et al., "The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 6, pp. 4617–4626, 2005.

- [56] Y. Uchida, K.-I. Ohba, T. Yoshioka, K. Irie, T. Muraki, and Y. Maru, "Cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat white adipocytes via reactive oxygen species-dependent pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 6, pp. 4075–4083, 2004.
- [57] C.-Y. Chen, A. M. Abell, Y. S. Moon, and K.-H. Kim, "An advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGEs (RAGE) axis restores adipogenic potential of senescent preadipocytes through modulation of p53 protein function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 53, pp. 44498–44507, 2012.
- [58] S. Chesne, P. Rondeau, S. Armenta, and E. Bourdon, "Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells," *Biochimie*, vol. 88, no. 10, pp. 1467–1477, 2006.
- [59] N. R. Singh, P. Rondeau, L. Hoareau, and E. Bourdon, "Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin," *Free Radical Research*, vol. 41, no. 10, pp. 1078–1088, 2007.
- [60] N. R. Singh, P. Rondeau, and E. Bourdon, "Identification of up-regulated low molecular weight proteins in human adipocytes treated with glycoxidized albumin," *The Open Obesity Journal*, vol. 2, no. 1, pp. 110–115, 2009.
- [61] Y. Unno, M. Sakai, Y.-I. Sakamoto et al., "Glycolaldehyde-modified bovine serum albumin downregulates leptin expression in mouse adipocytes via a CD36-mediated pathway," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1043, pp. 696–701, 2005.
- [62] S. Horiuchi, Y. Unno, H. Usui et al., "Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1043, pp. 671–675, 2005.
- [63] S. Maeda, T. Matsui, M. Takeuchi, and S.-I. Yamagishi, "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks advanced glycation end products (AGEs)-RAGE-induced suppression of adiponectin mRNA level in adipocytes by inhibiting NADPH oxidase-mediated oxidative stress generation," *International Journal of Cardiology*, vol. 152, no. 3, pp. 408–410, 2011.
- [64] N. Frizzell, M. Lima, and J. W. Baynes, "Succination of proteins in diabetes," *Free Radical Research*, vol. 45, no. 1, pp. 101–109, 2011.
- [65] N. Frizzell, M. Rajesh, M. J. Jepson et al., "Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 38, pp. 25772–25781, 2009.
- [66] H. Wassef, L. Bernier, J. Davignon, and J. S. Conn, "Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells," *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 11, pp. 2935–2941, 2004.
- [67] L. Izem and R. E. Morton, "Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 30, pp. 21856–21865, 2007.
- [68] G. Vassiliou and R. McPherson, "Role of cholesteryl ester transfer protein in selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by adipocytes," *Journal of Lipid Research*, vol. 45, no. 9, pp. 1683–1693, 2004.
- [69] D. Ramful, E. Tarnus, P. Rondeau, C. R. Da Silva, T. Baborun, and E. Bourdon, "Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs)- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human adipocytes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 20, pp. 11119–11129, 2010.
- [70] M. Roche, E. Tarnus, P. Rondeau, and E. Bourdon, "Effects of nutritional antioxidants on AAPH- or AGEs-induced oxidative stress in human SW872 liposarcoma cells," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25, no. 6, pp. 635–644, 2009.
- [71] O. Brouwers, P. M. Niessen, I. Ferreira et al., "Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 2, pp. 1374–1380, 2011.





# **Enhanced oxidative stress in adipose tissue from diabetic mice, possible contribution of glycated albumin**

**Florence Boyer<sup>a,b</sup>, Nicolas Diotel<sup>a,b</sup>, Dorothée Girard<sup>a,b</sup>, Philippe Rondeau<sup>a,b</sup>, M.  
Faadiel Essop<sup>c</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup>Inserm, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI),  
plateforme CYROI, Sainte-Clotilde, F-97490, France

<sup>b</sup>Université de La Réunion, UMR 1188, Sainte-Clotilde, F-97490, France

<sup>c</sup>Cardio-Metabolic Research Group (CMRG), Department of Physiological Sciences,  
Stellenbosch University, Merriman Avenue, Stellenbosch 7600, South Africa

**Published in:** *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*

**\* Corresponding author**

DÉTROI - Université de la Réunion - CYROI

2, rue Maxime Rivière – BP 80 005 - 97491 Sainte Clotilde Cedex

La Réunion – France - Tel: (+262) 262 93 91 92 - Fax: (+262) 262 93 88 01

[Emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr](mailto:Emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr)

## **Abstract**

Although enhanced oxidative stress and proteotoxicity constitute major contributors to the pathogenesis of multiple diseases, there is limited understanding of its role in adipose tissue. Here, we aimed at evaluating oxidative stress biomarkers in adipocytes from diabetic/obese db/db mice. The current study revealed that reactive oxygen species production was upregulated in adipocytes, together with lipid peroxidation 4-hydroxynonenal accumulation, and altered proteolytic and antioxidant activities. In parallel, acute exposure of 3T3L1 adipocyte cell lines to glycated albumin (known to be enhanced with diabetes) also elicited intracellular free radical formation. Our data provide novel insights into redox and proteolytic homeostasis in adipocytes.

**Keywords:** oxidative stress, hyperglycemia, diabetes, proteasome, glycated albumin

**Abbreviations:** AGE, advanced glycation end products; DHE, dihydroethidium; GPX, glutathione peroxidase; 4HNE, 4-hydroxynonenal; PBS, saline phosphate buffer; PUFA, polyunsaturated fatty acids; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

## **Highlights**

- Oxidative stress biomarkers are measured in adipocytes from diabetic mice.
- Enhanced ROS, altered proteolytic and antioxidant activities in db/db adipocytes.
- Glycated albumin elicited oxidative stress in 3T3L1 adipocyte cell lines.

## Introduction

Oxidative stress is defined as “an imbalance between oxidants and anti-oxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage” [1]. While reactive oxygen species (ROS) can act as signaling molecules, excessive amounts can induce lipid, DNA and protein oxidative damage thereby altering structure and function [1]. Under such circumstances antioxidant defences and/or repair processes can fail resulting in an imbalance in favor of greater intracellular ROS availability. However, under such conditions proteolytic mechanisms including the ubiquitin proteasome system (UPS) are activated to remove damaged, oxidized proteins [2].

Oxidative stress is robustly implicated in disease onset and increasing evidence implicates it in the development of insulin resistance [3,4]. Diabetes is a major health problem that is usually associated with obesity, together with hyperglycemia and advanced glycation endproducts (AGE) formation. The concept of redox imbalance (in fat tissues) as an instigator of adipocyte dysfunction with obesity is a recent phenomenon [5]. For example, oxidative stress impaired systemic insulin sensitivity and played a causative role in the development of insulin resistance in adipose tissues [4,6]. Here the role of the proteasome remains poorly understood and recent evidence established an important function in controlling redox homeostasis and in the degradation of oxidized proteins [7]. Moreover, despite increased evidences of enhanced AGE formation in the diabetes/obesity context, its involvement in adipocyte pathophysiology onset remains poorly understood [8]. As little is known regarding alterations in oxidative stress and protein homeostasis in adipose tissues, this study investigated redox homeostasis in adipocytes from the leptin receptor-deficient db/db transgenic mouse strain. To gain additional mechanistic insights, we also established an *in*

*vitro* experimental protocol to assess the deleterious effects of hyperglycemia and albumin-AGE on 3T3L1 cells by monitoring intracellular free radical formation.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

C57BLKs/J+/Lepr<sup>db</sup> mice (db/+) were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington MA). Male heterozygous db/+ and homozygous C57BLKs/J/Lepr<sup>db</sup> /Lepr<sup>db</sup> (db/db) mice (n=10 per group) were housed under constant temperature (21°±2°C), humidity (50% ± 5%) and a 12-hour light-dark cycle for a period of 12 weeks. Food and water were available *ad libitum* and all experimental procedures were conducted in compliance with animal protocols approved by the Animal Ethics Committee of Cyclotron Réunion Océan Indien (CYROI) (Project #01268.01).

### *Tissue collection and biochemical analyses*

Twelve-week old mice were fasted overnight, weighed, anesthetized and euthanized before fasting blood glucose levels measurement using the OneTouch® Ultra Blood Glucose Monitoring System (Lifescan). Blood was collected by cardiac puncture into EDTA tubes (BD Vacutainer®) and total proteins, cholesterol, albumin, fructosamine and triglycerides levels were determined using a clinical Biochemistry automated Cobas C501 analyzer (Roche Diagnostics). Epididymal adipose tissues were excised, snap frozen and stored at -80°C prior to analysis. Previously collected and stored epididymal adipose tissues were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen) in a phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM), DTT (1 mM), and EDTA (2 mM), pH 7.4). After centrifugation (5000 g/min for 10 min), the supernatant was used for protein quantification, carbonyl and enzymatic assays.

### *Immunohistochemistry and oxidative stress staining*

For immunohistochemistry, adipose tissues from db/+ and db/db mice were collected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. Paraffin sections (7  $\mu$ m) were prepared using a microtome (Thermo Scientific, Shandon™ Finesse™ ME+) and thereafter deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer (pH 6; 0.01 M) and sections were incubated overnight at room temperature with the 4-HNE antibody (1/100; Ref# ab46545; Abcam, Cambridge MA) in PBS-Triton containing 1% BSA. The next day sections were washed in PBS-Triton and incubated for 1 h 30 with secondary antibody (Alexa Fluor goat anti-rabbit 594; 1:200; Invitrogen Molecular Probes, Eugene OR). Sections were finally counterstained with DAPI and slides mounted with Vectashield anti-fading medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame CA).

For ROS imaging, unfixed adipose tissues were sampled and frozen at -80°C before being embedded in OCT (Tissue Tek, Sakura, Torrance, CA) and cut at 10  $\mu$ m thickness using a conventional cryotome (Thermo Scientific, Shandon™ Cryotome FE, France). Slides were defrosted for 1 hour at room temperature in a humidified chamber and subsequently incubated with 2  $\mu$ M DHE (dissolved in PBS; Sigma-Aldrich, Ref: D7008, France) in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min. Slides were subsequently washed twice in PBS and mounted with Vectashield anti-fading medium (Vector Laboratories, Burlingame CA).

### *Microscopy*

Prepared slides were viewed with a bright field/epifluorescence microscope Nikon Eclipse 80i equipped with a Hamamatsu ORCA-ER digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan). For 4 HNE immunohistochemistry and ROS staining, pictures were acquired using the Nikon software with similar exposure times between db/+ and db/db sections. Micrographs were

obtained in tiff format and adjusted for light and contrast before being assembled on plates in Adobe Photoshop CS4 (extended version 11.0).

#### *Thiol number determination*

Thiol groups were measured according to Ellman's assay using 5,5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid (DTNB) [9]. A standard curve was generated for each assay and here we used 10–100 nmol of L-cysteine (Sigma-Aldrich). Briefly, 100  $\mu$ L of tissue samples (in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, EDTA 5 mM) were incubated with three volumes of 0.5 mM DTNB and the free thiol concentration was calculated from absorbance readings (412 nm) with the help of a standard curve. Results are expressed in nmol of free -SH groups per  $\mu$ g protein.

#### *Enzymatic activity determination*

SOD activity was assayed by monitoring the rate of acetylated cytochrome c reduction by superoxide radicals generated by the xanthine/xanthine oxidase system. Measurements were performed in a reagent buffer (xanthine oxidase, xanthine (0.5mM), cytochrome c (0.2 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM), EDTA (2 mM), pH 7.8) at 25°C. The specific Manganese-SOD (Mn-SOD) activities were determined in the same condition after incubation of samples with NaCN (1 mM) which inhibits Cu/Zn-SOD activities. Assays were monitored by spectrophotometry at 560 nm. SOD activities were calculated using a calibration standard curve of SOD (up to 6 unit/mg). Total Mn-SOD and resulting Cu/Zn-SOD activities were expressed as international catalytic units per mg of proteins.

Glutathione peroxidase (GPX) activity was determined with cumene hydroperoxide as substrate [10]. The rate of glutathione oxidized by cumene hydroperoxide (6.5 mM) was evaluated by measuring NADPH (0.12 mM in Tris buffer) absorbance at 340 nm. Here the reaction buffer is composed of NaCN (10 mM), reduced glutathione (0.25 mM) and

glutathione reductase (1 U/ml) in Tris buffer (50 mM, pH 8). GPX activity was expressed as international units per gram of proteins.

The catalase activity assay was performed on 40 µg of protein lysate in 25 mM Tris–HCl (pH 7.5). Blanks were measured at 240 nm just before adding 80 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM final) to start the reaction. Catalase activity was determined by measuring the absorbance at 240 nm and calculated using a standard calibration curve constructed by increasing catalase amounts (between 12.5 and 125 units/ml). Catalase activity was expressed as international catalytic units per mg of proteins.

Proteasome activity measurements, i.e. chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like activities of the proteasome were assayed using fluorogenic peptides (Sigma-Aldrich, St Louis): Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVYMCA at 25 mM), N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LSTR-MCA at 40 mM) and N-Cbz-Leu-Leu-Glu-bnaphthylamide (LLE-NA at 150 mM), respectively, as described previously [11].

### *3T3 L1 cell line*

3T3L1 cells were cultured in completed DMEM medium (10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) and L-glutamine (2 mM) and grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Prior to treatments, 3T3 L1 cells were cultured in DMEM containing 1% FBS in 96-well plates (10 000 cells/well) for 24 hours to reach about 75% confluency. At this stage cells were treated for 1 hour under simulated normoglycemic conditions (5 mM glucose) in the absence (NG) or presence of 80 µM of native albumin (HSA<sub>G0</sub>), glycated albumin (HSA<sub>MGO</sub>) versus simulated hyperglycemic conditions (25 mM glucose; HG).

### *Cell viability and intracellular ROS determination*

To assess cell viability, we employed the crystal violet DNA staining assay that was adapted from Saotome et al. [12]. The medium was removed after treatments, cells were washed twice, and then 200  $\mu$ L of 5 mg/mL crystal violet solution was added to each well and incubated for 15 min. The plate was carefully washed (5x) by immersion in a large beaker with water. 100  $\mu$ L of 1 % sodium dodecyl sulphate was then added to each well to solubilize the stain and absorbance read at 570 nm. Results were expressed as percentage of untreated cells. Intracellular oxidative stress in treated 3T3L1 cells was evaluated by using the dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe as described previously [13]. Results were expressed as percentage of fluorescence in relation to the control.

#### *Dot-blot analysis*

Each tissue homogenate sample (about 30  $\mu$ g protein) was spotted onto a dry nitrocellulose membrane by using a grid from pipette tip rack as a guide. The membrane was air-dried for 15 min and was washed twice in acetic acid for 2 min. The membrane was initially blocked with PBS/Tween 20 0.1% (v/v)/ milk 5% for 3 hours at room temperature and then sequentially probed for another 3 hours with a primary antibody directed against 4 HNE (1:1000; Ref# ab46545; Abcam, Cambridge MA). This was followed by secondary antibody incubation for at least 1 hour (1:2000; Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L); Jackson Immunoresearch Laboratories Inc; Ref# 111-035-003). Between each step, membranes were washed three times with PBS/Tween 20 0.1% (v/v). Detection was performed using the enhanced chemiluminescence reagent (ECL<sup>®</sup>, GE Healthcare). Signal intensities were quantified using the freeware ImageJ (version 1.32j) available from the internet website: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

#### *Statistical analysis*



Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) from at least three experiments. Figures and pictorial representations are representative of at least three independent observations. Statistical significance was determined using the Student's t-test, with a p-value  $< 0.05$  required for significance.

## Results

### *Biochemical characterization of db/db diabetic mice*

Mice were sacrificed at 12 weeks of age and body weights together with classic biochemical parameters were measured (refer Table 1). The db/db mice displayed an obese phenotype, i.e. a 58% difference in body weight compared to db/+ controls ( $p < 0.001$ ). In support, epididymal adipose tissue (EAT) weight was substantially higher in the db/db group versus db/+ mice ( $p < 0.001$ ). Despite their relatively young age, db/db mice also exhibited significantly enhanced fasting glycemia compared to the heterozygote group, thus confirming diabetic status. In addition, serum fructosamine, cholesterol and triglyceride levels were increased in db/db mice compared to controls. The db/db mice were also insulin resistant as demonstrated by the 5-fold increase in the HOMA index versus db/+ mice ( $p < 0.001$ ).

### *Enhanced ROS production in adipose tissue of db/db mice*

We also found enhanced cytosolic superoxide production (DHE probe) in EAT isolated from db/db mice (Figure 1A). Histological analyses also revealed adipocyte hypertrophy in EAT isolated from the db/db mice (data not shown). Despite lower cell numbers in experimentally defined areas, we found significantly more DHE positive cells in EAT isolated from db/db versus db/+ mice (Figure 1B). To further support our DHE data we also evaluated thiol number as a marker of oxidative damage. Here there was a significant decrease of 39 % in thiol number in db/db EAT compared to matched controls (Figure 2).

#### *Increased 4-HNE in adipose tissues of db/db mice*

In agreement with our earlier data, there was a much higher accumulation of the lipid peroxidation product 4-HNE in db/db adipose tissues as clearly evidenced by the immunohistochemistry staining (Figure 3A). In addition, dot blot analyses revealed that the 4-HNE concentration was significantly up regulated in db/db adipose tissue versus respective controls reinforcing the previous data (Figure 3B and 3C).

#### *Impaired antioxidant activities in adipose tissues isolated from diabetic mice*

Cu/Zn and MnSOD enzyme activities were significantly increased (+38%) in db/db EAT versus db/+ controls (Figure 4). Interestingly, such enhanced SOD activity was not associated with any adaptive antioxidant enzyme upregulation for catalase or glutathione peroxidase activities. In support, no significant variation in SOD, catalase and glutathione peroxidase mRNA levels were found when assessed by real-time PCR (data not shown).

#### *Proteasomal activities are enhanced in adipose tissue from diabetic mice*

Trypsin-like, chymotrypsin-like activities were evaluated in adipose tissue homogenates using fluorogenic peptides and here a 3- to 4-fold increase were measured in adipose tissues isolated from db/db mice (Figure 5). In our experimental conditions, no caspase-like activity of the proteasome was detected in EAT.

#### *Glycated albumin and hyperglycemia induced oxidative stress in murine adipocytes*

Unpublished data from our group previously revealed that fluorescent AGE, carbonyl levels and glycoxidation of serum albumin were significantly higher in plasma of db/db mice, reflecting a general impairment of redox regulation in this group. To gain further insight into

the mechanisms whereby redox homeostasis is impaired in adipose tissues of diabetic mice, 3T3 L1 mouse cell lines were incubated under simulated normo- and hyperglycemic conditions  $\pm$  native or glycated albumin (Figure 6). Hyperglycemia and glycated albumin treatment induced a robust increase in intracellular ROS formation (+50%,  $p < 0.001$  vs. NG or HSA<sub>GO</sub>). The latter effects were observed in the absence of any toxic impact of hyperglycemic or glycated albumin cellular treatments.

## Discussion

An emerging paradigm is that redox imbalances in fat tissue may play a pivotal role in the onset of adipocyte dysfunction with obesity [5]. For example, oxidative stress in fat cells impaired systemic insulin sensitivity and is an early instigator of insulin resistance onset [4,6]. However, despite such progress a number of questions remains concerning diabetes-related protein oxidative modifications in adipose tissues. The present study therefore investigated this question and revealed enhanced ROS formation and 4-HNE accumulation together with altered antioxidant enzyme capacity and UPS responses. In support, 3T3L1 adipocytes exposed to glycated albumin also exhibited an altered redox balance. These data are consistent with our previous findings where glycated albumin exposure induced oxidative stress in primary human adipocytes thereby leading to the accumulation of oxidized proteins [14,15].

It is our opinion that antioxidant enzyme activities of SOD, catalase and glutathione peroxidase provide unique insights into the origins of the enhanced adipocyte ROS formation with diabetes. These data support the concept that enhanced SOD activity (not counteracted by elevated catalase and/or glutathione peroxidase activities) is an early biomarker of increased superoxide production and redox imbalance in adipose tissues of diabetic mice.

Indeed, elevated ROS production and oxidative damage were previously observed in the cortexes of SOD overexpressing mice[16]. The impact of increased ROS levels on protein oxidative modifications is supported by the reduction of thiols in adipose tissues of db/db mice. The conversion of SH groups into disulfides constitutes one of the early steps of protein oxidation [17]. Thiol reduction can arise from protein succination that occurs due to the reaction of fumarate (Krebs cycle intermediate) with protein cysteine residues [18]. Our results are indeed in full accordance with recent reports showing enhanced succination of thiol groups resulting from mitochondrial stress in adipose tissues of db/db mice [19,20]. In our db/db mice model, oxidative damage at the adipose tissue level were also confirmed by 4-HNE accumulation, an end-product of n-6 PUFAs peroxidation. Protein-HNE adducts were previously described as long-lived “footprints” of lipid peroxidation and recently proposed as a suitable and metastable biomarker for *in vivo* adipose tissue oxidation and dysregulation [21].

Although the role of the proteasome in adipocytes remains largely unexplored, the few examples present in the literature favor a determinant role in redox homeostasis regulation and cellular differentiation, therefore influencing the development of obesity [22] [7,23]. In the present study, trypsin- and chymotrypsin-like activities were significantly increased in adipose tissues from diabetic mice. In agreement, we recently found enhanced trypsin-like activity and low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) subunit expression of the proteasome in human adipose cells exposed to hyperglycemic conditions [24]. Such elevated proteolytic activity may be considered a defense system triggered by the oxidative stress insult. In support, a model of oxidative stress-dependent regulation of the proteasome was recently proposed where increased proteasomal expression is linked to conditions of persistent and prolonged exposure to oxidative stress [25]. Thus in our experimental system,

the proteasome system may be rapidly overwhelmed by oxidative stress and resulted in protein oxidation that accumulates in adipose tissues from diabetic mice.

Although the precise mechanism(s) whereby redox balanced is impaired in diabetic adipose tissues are likely to be multifactorial, our group hypothesized enhanced glycated albumin-derived AGE as a potent contributor to adipocyte dysfunction [8]. Of note, an inverse association was found between circulating AGE and fat mass in adults [26] and the authors explained their intriguing observation by AGE accumulation in fat tissues or altered adipocyte AGE metabolism [26]. In addition, unpublished data from our group revealed that albumin modifications in the plasma of diabetic mice resembled those typically found in diabetic patients, i.e. in terms of the degree of glycation, carbonylation and AGE levels. In the present study, enhanced ROS formation in adipose tissue of diabetic mice was reproduced by the incubation of 3T3L1 mouse adipocytes exposed to glycated albumin. Here our findings established that glycated albumin exposure triggered increased ROS production together with attenuated adipocyte cell viability. Thus it is likely that higher AGE levels with diabetes may be a key mediator of increased oxidative stress in adipocytes and damaging downstream effects. In addition, oxidative stress can also fuel AGE generation thus establishing a vicious metabolic cycle [27] that can further exacerbate adipocyte dysfunction. However, further studies are required to clarify this. In summary, our study reveals novel insights into redox imbalance in adipocytes of diabetic/obese mice and highlights the role of AGE (especially glycated albumin) as a putative contributor to adipocyte dysfunction.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université de La Réunion and by the Conseil régional de La Réunion, France and Europe

(« Redox project »). FB is recipient of a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion, France and Europe.

**Authors have no interest conflict to declare**

**Author contributions**

**FB:** acquisition of data; drafting the article, final approval

**ND:** acquisition of data; drafting the article, final approval

**DG:** acquisition of data; drafting the article, final approval

**PR:** acquisition of data; drafting the article, final approval

**MFE:** conception and design of the study, drafting the article, final approval

**EB :** conception and design of the study, drafting the article, final approval

## References

- [1] Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4, 180-3.
- [2] Davies, K.J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83, 301-10.
- [3] Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 47-95.
- [4] Houstis, N., Rosen, E.D. and Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-8.
- [5] Jankovic, A., Korac, A., Buzadzic, B., Otasevic, V., Stancic, A., Daiber, A. and Korac, B. (2015). Redox implications in adipose tissue (dys)function-A new look at old acquaintances. *Redox Biol* 6, 19-32.
- [6] Furukawa, S. et al. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752-61.
- [7] Diaz-Ruiz, A. et al. (2015). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal* 23, 597-612.
- [8] Boyer, F., Vidot, J.B., Dubourg, A.G., Rondeau, P., Essop, M.F. and Bourdon, E. (2015). Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGE. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 534873.
- [9] Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-7.
- [10] Tappel, A.L. (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52, 506-13.
- [11] Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E. and Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 582, 1783-7.
- [12] Saotome, K., Morita, H. and Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol In Vitro* 3, 317-21.
- [13] Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Dubois, F., Payet, B., Bourdon, E. and Rondeau, P. (2013). New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3532-41.

- [14] Chesne, S., Rondeau, P., Armenta, S. and Bourdon, E. (2006). Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie* 88, 1467-77.
- [15] Singh, N.R., Rondeau, P., Hoareau, L. and Bourdon, E. (2007). Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res* 41, 1078-88.
- [16] Le Pecheur, M., Bourdon, E., Paly, E., Farout, L., Friguet, B. and London, J. (2005). Oxidized SOD1 alters proteasome activities in vitro and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. *FEBS Lett* 579, 3613-8.
- [17] Bourdon, E. and Blache, D. (2001). The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 3, 293-311.
- [18] Blatnik, M., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (2008). Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1126, 272-5.
- [19] Thomas, S.A., Storey, K.B., Baynes, J.W. and Frizzell, N. (2012). Tissue distribution of S-(2-succino)cysteine (2SC), a biomarker of mitochondrial stress in obesity and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 20, 263-9.
- [20] Frizzell, N., Rajesh, M., Jepson, M.J., Nagai, R., Carson, J.A., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (2009). Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. *J Biol Chem* 284, 25772-81.
- [21] Murdolo, G., Bartolini, D., Tortoioli, C., Piroddi, M., Iuliano, L. and Galli, F. (2013). Lipokines and oxysterols: novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. *Free Radic Biol Med* 65, 811-20.
- [22] Dasuri, K., Zhang, L., Ebenezer, P., Fernandez-Kim, S.O., Bruce-Keller, A.J., Szweda, L.I. and Keller, J.N. (2011). Proteasome alterations during adipose differentiation and aging: links to impaired adipocyte differentiation and development of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51, 1727-35.
- [23] Wing, S.S. (2008). The UPS in diabetes and obesity. *BMC Biochem* 9 Suppl 1, S6.
- [24] Boyer, F., Rondeau, P. and Bourdon, E. (2014). Hyperglycemia induces oxidative damage in SW872 cells. *Arch Med Biomed Res.* 1, 66-78.
- [25] Pajares, M. et al. (2015). Redox control of protein degradation. *Redox Biol* 6, 409-20.



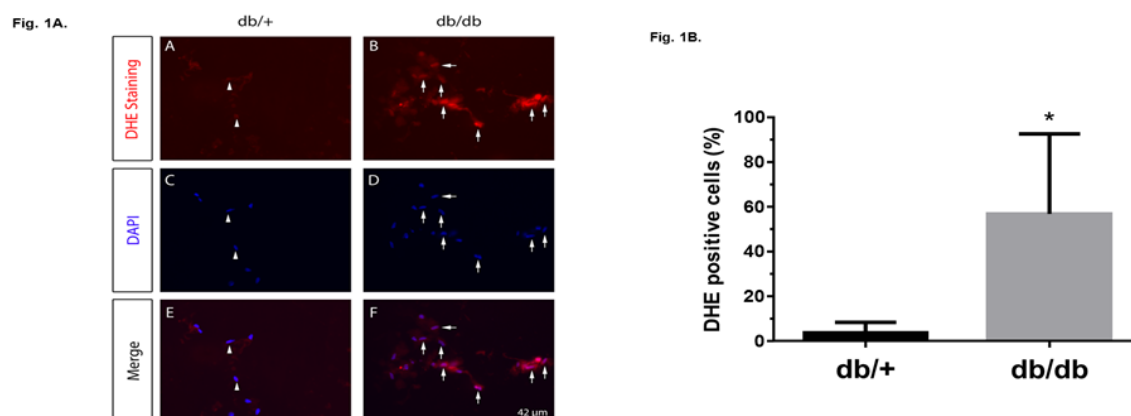
- [26] Semba, R.D., Arab, L., Sun, K., Nicklett, E.J. and Ferrucci, L. (2011). Fat mass is inversely associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults. *J Nutr* 141, 1726-30.
- [27] Mapanga, R.F. and Essop, M.F. (2016). Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310, H153-73.

**Table 1: Analytical characteristics of diabetic (db/db) and control heterozygous (db/+) mice.**

All clinical, metabolic and oxidative parameters were determined at 12 weeks of age. EAT, epididymal adipose tissue; HOMA-IR, homeostatic model assessment insulin resistance. Values are shown as mean  $\pm$  SD (n=10). \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 indicate a significant difference versus db/+ group.

	db/+	db/db
n	10	10
Body weight (g)	29.6 $\pm$ 1.2	46.7 $\pm$ 3.3***
EAT (g)	0.55 $\pm$ 0.1	2.43 $\pm$ 0.21***
Fasting glycemia (mg/dL)	56.6 $\pm$ 14.0	315 $\pm$ 66***
HOMA IR	4.04 $\pm$ 2.54	21.9 $\pm$ 5.1***
Total protein	41.6 $\pm$ 2.2	48.3 $\pm$ 5.1***
Albuminemia (g/L)	29.3 $\pm$ 1.9	31.4 $\pm$ 1.6***
Fructosamine (mmol/L)	311 $\pm$ 69	535 $\pm$ 100***
Cholesterol (mmol/L)	2.04 $\pm$ 0.23	2.64 $\pm$ 0.51***
Triglycerides (mmol/L)	1.27 $\pm$ 0.27	2.31 $\pm$ 0.65***

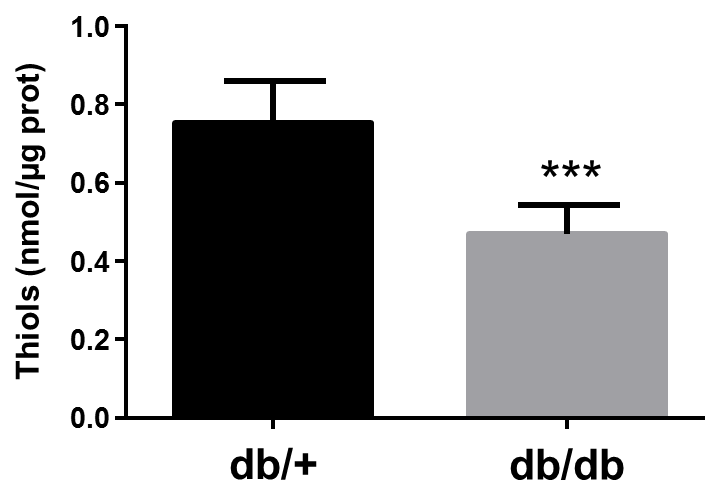
## Figures



**Figure 1: Enhanced ROS production in adipose tissues of db/db mice.**

ROS staining (DHE dye) was performed on adipose tissues isolated from heterozygous and diabetic mice (n=3) (Fig 1A). Low ROS levels are detected in control mice as shown by the arrowhead (A, C and E). However, ROS production is markedly increased in the adipose tissue of db/db versus db/+ mice (see arrows in B, D and F). DHE positive cells were counted and expressed in a percentage of total cells (adipose tissue) from heterozygous and diabetic mice (Fig 1B). Data are expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by the Student's t-test for unpaired samples (n=4 to 5): \*P<0.05 versus db/+ group.

Fig. 2.



**Figure 2: Reduced thiol content in adipose tissues of db/db mice.**

Thiol levels were assessed in adipose tissues using Ellman's assay and following previously published procedures[13]. Data are expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by the Student's t-test for unpaired samples (n= 5): \*\*\*P<0.001 versus db/+ group.

Fig. 3 A.

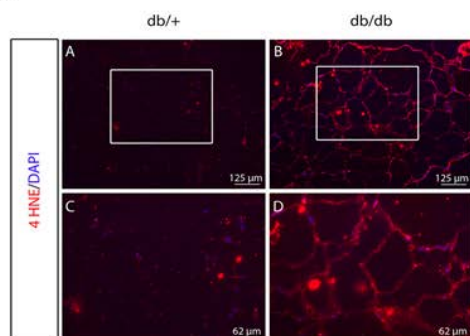


Fig. 3 B.

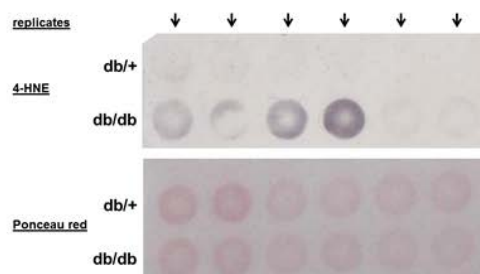
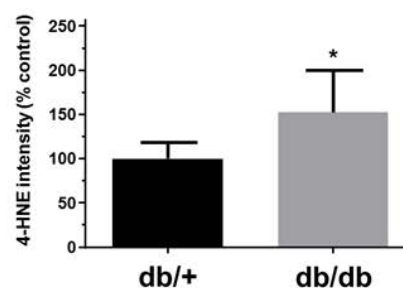


Fig. 3 C.



### Figure 3: 4-hydroxynonenal (4-HNE) is increased in adipose tissues of db/db mice.

4-HNE-modified proteins were assessed by immunohistochemistry and dot blotting. Enhanced 4-HNE labelling is observed in the cytoplasm and membranes of adipose tissues from db/db versus db/+ mice (Fig 3A). 4-HNE-modified proteins were assessed by dot-blot (Fig 3B) and data summarized by signal quantification (Fig 3C). Data are expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by the Student's t-test for unpaired samples (n= 5-6): \*P<0.05 versus db/+ group.

Fig. 4 A.

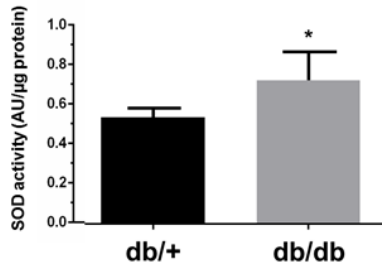


Fig. 4 C.

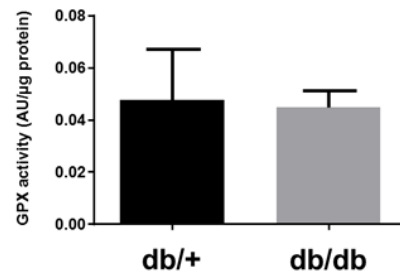
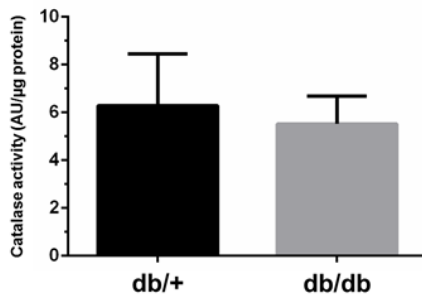


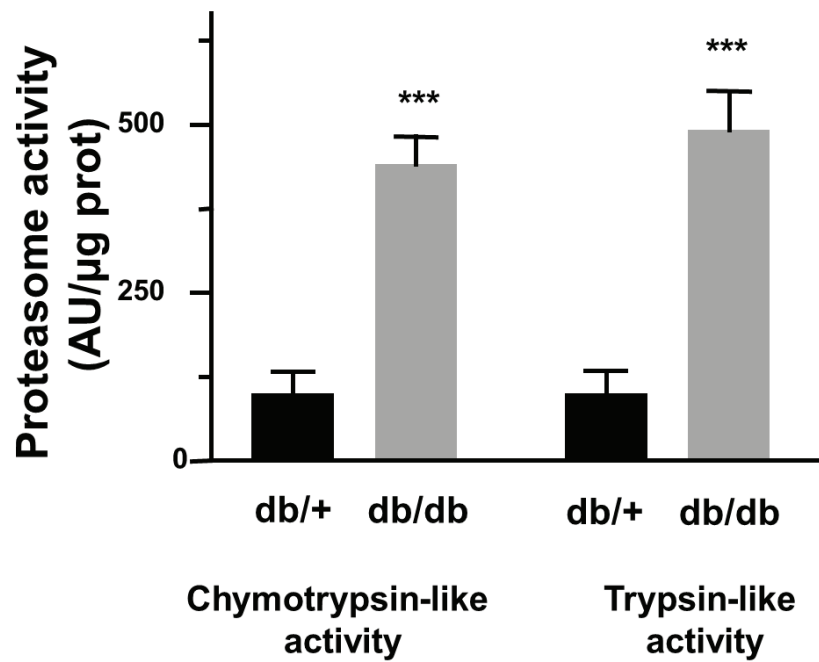
Fig. 4 B.



**Figure 4: Impaired antioxidant activities in adipose tissues from diabetic mice.**

Superoxide dismutase (Cu/Zn and Mn), catalase and glutathione peroxidase enzymatic activities are reported in Figures A, B and C, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by the Student's t-test for unpaired samples (n= 5-6): \*P<0.05 versus db/+ group.

**Fig. 5.**



**Figure 5: Proteasomal activities are enhanced in adipose tissues from diabetic mice.**

Trypsin-like, chymotrypsin-like activities were evaluated in the homogenates of adipose tissues isolated from db/db and db/+ mice using fluorogenic peptides. The data are expressed as mean  $\pm$  SD (n= 5) and significance determined by using the Student's t-test for unpaired samples: \*\*\*P<0.001 versus db/+ group.

Fig. 6A.

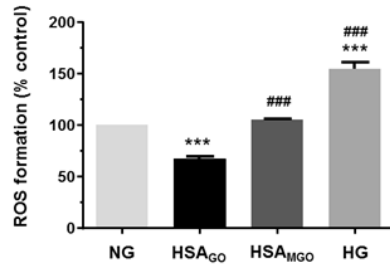
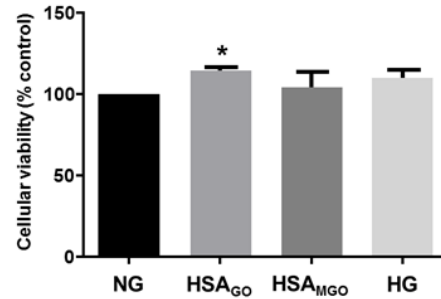


Fig. 6B.



**Figure 6: Glycated albumin and hyperglycemia induce oxidative stress in murine adipocytes.**

Intracellular ROS production and viability of 3T3 L1 cell line were determined by DCF fluorescence (Fig 6A) and crystal violet (Fig 6B) measurements, respectively. The relative variation (%) in DCF fluorescence and crystal violet measurement (vs. normoglycemic condition, NG) were determined for cells incubated for 1 hour with 80  $\mu$ M of native albumin (HSA<sub>G0</sub>), glycated albumin (HSA<sub>MGO</sub>) or under simulated hyperglycemic conditions (HG). All data are expressed as mean  $\pm$  SD of four independent experiments. Statistics were performed using the Student's t-test for unpaired samples: \*\*\*P<0.001, \*P<0.05 (compared to NG condition), ###P<0.001 (compared to HSA<sub>G0</sub>).

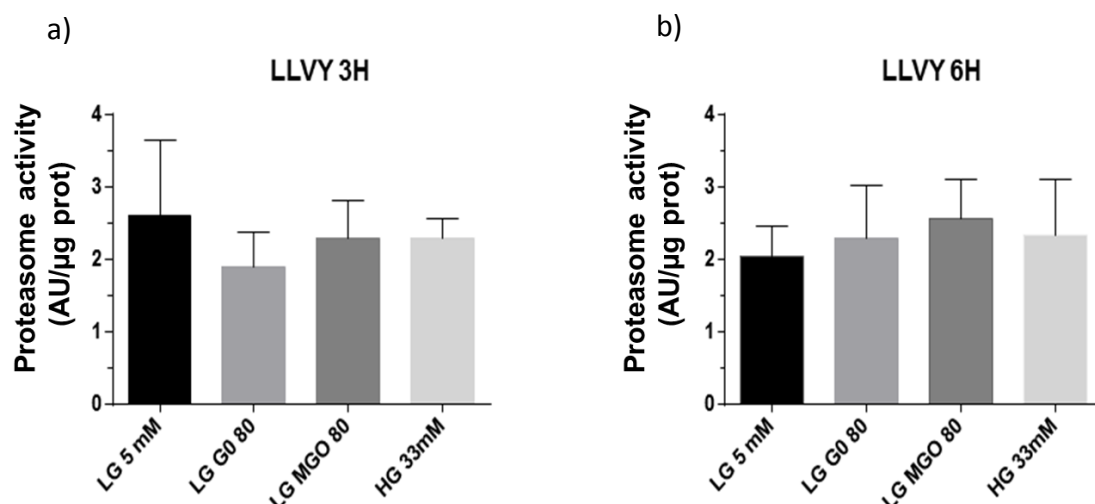


## Discussion

Le tissu adipeux des souris db/db présente un déséquilibre de son statut redox, avec une augmentation de marqueur du stress oxydant. Ainsi, on observe une augmentation du taux de ROS chez les souris db/db, ainsi que d'un marqueur de peroxydation lipidique : le 4-HNE. Au niveau des cellules 3T3L1, l'expression du 4-HNE n'a pas, ou très faiblement, été détectée par dot blot. Un très faible signal a pu être détecté pour les cellules traitées en condition d'hyperglycémie pendant six heures (résultats non montré).

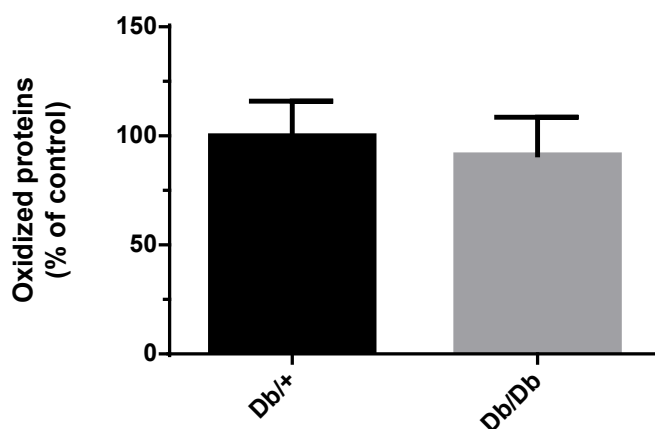
Il existe très peu de référence concernant la mesure des activités anti-oxydantes au niveau du tissu adipeux et des cellules adipeuses. Par ailleurs les activités anti-oxydantes (SOD, catalase) au niveau des cellules 3T3L1 n'ont pas été détectées du fait de la trop faible quantité de protéine ou d'une activité trop faible dans ces conditions de traitement. Au niveau des souris db/db, seule l'activité SOD est augmentée. Au niveau des souris db/db, j'ai regardé l'expression de certains gènes d'enzyme anti-oxydante (résultats **annexe 3**), dont la catalase et la GPx. On n'observe pas de variation significative concernant l'expression des gènes chez les souris db/db comparé au souris db/+. De plus les variations intragroupes sont très importantes.

Chez les souris db/db, les activités du protéasome sont dérégulées et fortement augmentées. Une augmentation des activités du protéasome au niveau d'autre modèle de cellules adipeuse, les SW872, a par ailleurs déjà été démontrée. Cependant, pour les activités du protéasome au niveau des cellules 3T3L1, seule l'activité LLVY a pu être détectée et mesurée (**Figure 20**). Cette mesure n'a montré aucune modulation de l'activité du protéasome en condition de stress oxydant, avec les temps de traitement employés dans cette étude.



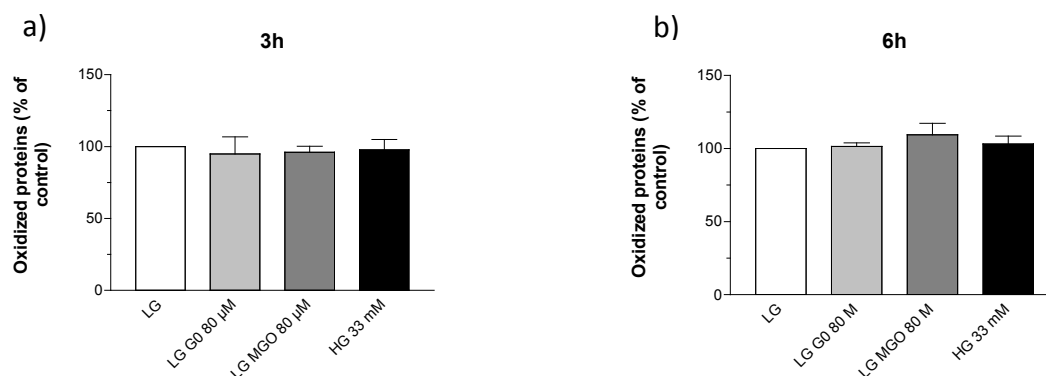
**Figure 20. Activité de type chymotrypsine du protéasome des cellules 3T3L1.** A) mesure après 3 heures de traitement (N=3); B) mesure après 6 heures de traitement (N=3). Les traitements sont effectués en présence de 80 μM de BSA native ou glyquée ou en présence de glucose 33 mM.

Le protéasome étant responsable de la dégradation des protéines oxydées, j'ai cherché à déterminer le taux de protéines oxydées au niveau du TAE de souris db/db, ainsi que au niveau des cellules 3T3L1.



**Figure 21. Taux de protéines carbonylées déterminé par ELISA du TAE de souris db/db.** (N=8)

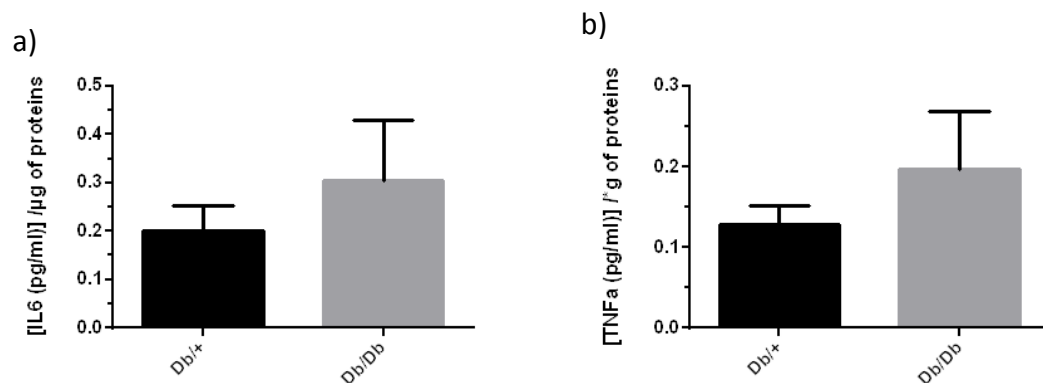
Chez les souris db/db, le taux de protéines oxydées ne varie pas par rapport au taux de protéines oxydées des souris contrôles (**Figure 21**). L'hypothèse émise est que l'activation du protéasome va permettre de maintenir le taux de protéines oxydées à un taux basal.



**Figure 22. Taux de protéines oxydées déterminé par ELISA des cellules 3T3L1.** A) mesure après 3 heures de traitements (N=3) ; B) mesure après 6 heures de traitement (N=3). Les traitements sont effectués en présence de 80  $\mu$ M de BSA native ou glyquée ou en présence de glucose 33 mM.

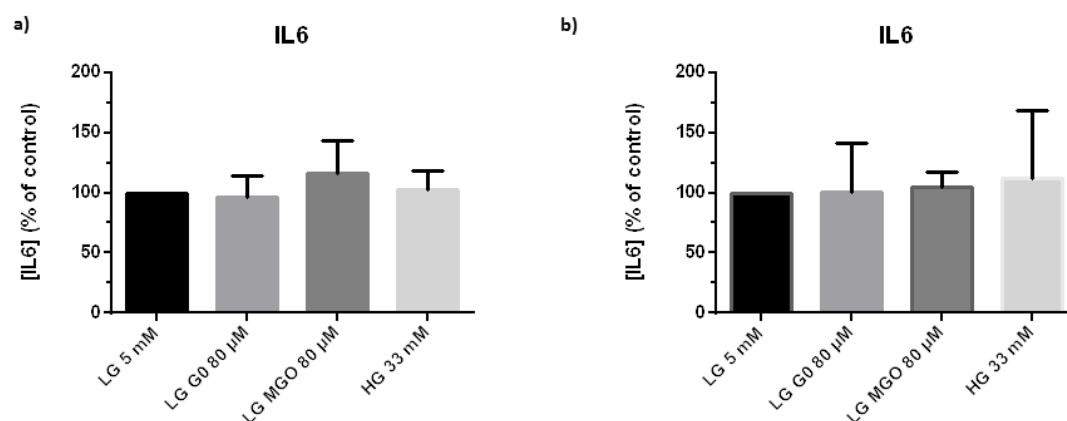
Pour les cellules 3T3L1, la situation est différente : on n'observe pas d'activation du protéasome, et le taux de protéines oxydées est similaire d'un traitement à l'autre (**Figure 22**). Il est possible que les temps de traitements appliqués ici soient trop courts pour entrainer l'accumulation de protéines oxydées ainsi que l'activation du protéasome.

Je me suis par la suite intéressée au statut inflammatoire des souris db/db mais aussi au niveau des cellules 3T3L1. Chez les souris db/db, j'ai pu analyser, par ELISA, les taux d'IL6 et de TNF $\alpha$ , deux cytokines pro-inflammatoire.



**Figure 23. Expression d'IL6 et TNFα par ELISA chez les souris db/db.** A) Expression d'IL6 (N=5) ; B) Expression de TNFα (N=5)

Ici, on peut observer une augmentation non significative de 52% de l'expression d'IL6 chez les souris db/db, ainsi qu'une augmentation non significative de 43% de l'expression de TNFα (Figure 23).



**Figure 24. Expression d'IL6 des cellules 3T3L1.** A) mesure après 3 heures de traitements (N=4) ; B) mesure après 6 heures de traitement (N=4). Les traitements sont effectués en présence de 80 μM de BSA native ou glyquée ou en présence de glucose 33 mM.

Au niveau des cellules 3T3L1, aucune variation au niveau de l'expression de marqueur pro-inflammatoire n'est observée que ce soit après 3 heures ou après 6 heures de traitement (Figure 24).

Enfin, dans une dernière partie je me suis intéressée à l'expression d'un récepteur aux AGE, le récepteur RAGE. L'expression de RAGE au niveau du TAE a été analysée avec en utilisant le protocole DAKO EnVision+ Dual Link System-HRP. Les résultats n'ont montré aucune différence au niveau de l'expression de RAGE au niveau du TAE de souris db/db comparé au souris db/+ (résultats en **annexe 4**).

La présence d'un stress oxydant entraînant un dysfonctionnement adipocytaire est manifeste au niveau des souris db/db. Les mécanismes entraînant un dysfonctionnement au niveau de la balance redox peuvent être multiples. L'hypothèse émise était que l'hyperglycémie mais aussi la présence d'AGE étaient impliquées dans la génération d'un stress oxydant conduisant à un dysfonctionnement des adipocytes. Chez les souris db/db, un taux élevé d'AGE plasmatique a été retrouvé. Au niveau des cellules 3T3L1, l'hyperglycémie mais aussi la présence d'albumine glyquée, va entraîner la production d'espèce réactive de l'oxygène. Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des AGE, dans le dysfonctionnement des adipocytes, dans le cadre de la pathologie diabétique.



## **Etude 4 : Impact du stress oxydant induit par l'hyperglycémie et l'albumine glyquée au niveau cardiaque**

### **Introduction**

Les personnes diabétiques ont une plus forte propension à développer des maladies cardiovasculaires, telles que les accidents vasculaires cérébraux, les maladies coronariennes, athérombose ou l'hypertrophie ventriculaire (205,232). Cependant, les mécanismes liant l'hyperglycémie aux maladies cardiovasculaires, et conduisant à la propagation des lésions macro et micro-vasculaires restent assez méconnus.

Nous avons proposé comme hypothèse que le stress oxydant ainsi que l'activation des NOGPs (nonoxidative glucose pathways), seraient impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires. Parmi ces voies, on retrouve celle des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C et les voies conduisant à la formation des AGE. Ces voies sont principalement activées en condition d'hyperglycémie chronique et contribuent à l'augmentation du stress oxydant.

La présence d'AGE favorise le développement de maladies cardiovasculaires. En effet, les AGE sont sources de stress oxydatif et leur interaction avec leur récepteur RAGE entraîne la production des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL6 (162,233). L'albumine est la protéine la plus abondante du sérum, ce qui en fait une cible privilégiée pour les phénomènes de glycation. Il a été démontré que l'albumine exerce un pouvoir protecteur contre les dommages liés à l'ischémie re-perfusion (234). L'hypothèse émise est que lorsque l'albumine est glyquée, celle-ci perd ses capacités de protection à la fois durant l'ischémie re-perfusion et dans des conditions d'hyperglycémie.

Dans la première étude, nous nous sommes intéressés à des cœurs de rat isolés re-perfusés avec de l'albumine native ou glyquée dans des conditions de normoglycémie ou d'hyperglycémie. Lors de cette étude, les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de l'albumine ont été étudiées, ainsi que ses effets cardio-protecteurs.

Dans la deuxième étude, le modèle de souris diabétique db/db mais aussi les cellules cardiaques H9C2, a été utilisé. Lors de cette étude, j'ai étudié les dommages oxydatifs au niveau cardiaque (présence de produit de peroxydation lipidique, activation du protéasome), ainsi que l'activation des NOGPs, en condition d'hyperglycémie ou en présence d'albumine glyquée.



# Glycation abolishes the cardioprotective effects of albumin during ischemia-reperfusion

Rudo F. Mapanga<sup>1</sup>, Danzil E. Joseph<sup>1</sup>, Florence Boyer<sup>2</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>2</sup>  
and M. Faadiel Essop<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cardio-Metabolic Research Group (CMRG), Department of Physiological Sciences, Stellenbosch University, Stellenbosch 7600, South Africa

<sup>2</sup>Inserm UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI) Université de La Réunion, Plateforme CYROI, Saint Denis de La Réunion, France

*(These authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation).*

The authors hereby confirm that no conflict of interests and no competing financial interests exist.

This work was supported by the South African National Research Foundation (Grant #93506) and Stellenbosch University (to MFE).

**Keywords:** hyperglycemia; advanced glycation end products; glycation; albumin; myocardial ischemia

**Word count:** 1,192 (excluding title page, acknowledgments, references, figure legends)

**\*Corresponding author:**

Dr. M. Faadiel Essop  
Cardio-Metabolic Research Group (CMRG)  
Department of Physiological Sciences  
Stellenbosch University  
Room 2009, Mike De Vries Building  
Merriman Avenue  
Stellenbosch 7600  
South Africa  
Tel: +27 21 808 4507  
Fax: +27 21 808 3145  
E-mail: [mfessop@sun.ac.za](mailto:mfessop@sun.ac.za)

## Abstract

Hyperglycemia-induced oxidative stress is the major perpetrator in cardiovascular disease. We have previously reported increased formation of advanced glycation end products as one of ways that increase reactive oxygen species under hyperglycemic conditions with ischemia and reperfusion. Hence we hypothesize that with hyperglycemia albumin glycation occurs and results in the loss of its antioxidant capacity. *Ex vivo* rat heart perfusions were performed with Krebs-Henseleit buffer (33 mM glucose vs. controls 11 mM glucose) ± normal albumin/ glycated albumin for 60 min stabilization, followed by 20 min global ischemia and 60 min reperfusion. In similar parallel experiments, infarct sizes were assessed following 20 min regional ischemia and 120 min reperfusion. Heart tissues were collected and analyzed for markers of oxidative stress, UPS activation and inflammation. Native bovine serum albumin resulted in cardioprotection, whereas glycated albumin caused a decrease in cardiac function, turning on damaging pathways. This was associated with enhanced cardiac superoxide dismutase protein levels and attenuated pro-inflammatory effects. This study established that albumin glycation results in the loss of the albumin's capacity as an antioxidant under hyperglycemic conditions. Albumin may act as novel therapy for the treatment of ischemic heart disease under such conditions.

**Keywords:** albumin; ischemia-reperfusion; cardiac dysfunction; hyperglycemia; oxidative stress; glycation.

## **Background**

Albumin is a highly soluble protein that contains 585 amino acids and has a molecular weight of 66kDa (235)]. It is abundant in serum with a broad range of biological properties, including it functioning as an antioxidant in circulation (235,236)] and within target cells [reviewed in (237)]. This allows it to exert beneficial effects with the onset of various pathophysiologic conditions, e.g. albumin protected against ischemia-reperfusion injury (238)]. However, disease states such as diabetes can trigger modifications that are associated with vascular complications. Here hyperglycemia results in albumin glycation by the non-enzymatic attachment of glucose molecules to free primary amine residues that eventually results in the formation of advanced glycation end products (AGE) [reviewed in (239)]. Furthermore epidemiological studies established an inverse relationship between serum albumin level and mortality risk; this is also the case with cardiovascular diseases (240,241)]. We previously reported on the damaging effects of increased myocardial AGE formation with *ex vivo* ischemia-reperfusion performed under hyperglycemic conditions (242)]. In light of this, we hypothesized that albumin glycation results in loss of its cardioprotective properties during ischemia-reperfusion under experimental conditions simulating acute hyperglycemia.

## **Materials and Methods**

### **Animals and ethics statement**

This study was carried out with the approval of the Animal Ethics Committee of Stellenbosch University and animals treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Academy of Sciences (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

### ***Ex vivo* perfusion protocol**

Male Wistar rats (180-220 gr) were anesthetized (pentobarbitone, 100 mg/kg i.p.) and hearts rapidly excised and perfused in a modified Langendorff model as described before by our laboratory (243)]. During perfusion, a latex balloon attached to a pressure transducer (Stratham MLT 0380/D, ADInstruments Inc, Bella Vista NSW, Australia) compatible with the PowerLab System ML410/W (ADInstruments Inc, Bella Vista NSW, Australia) was inserted into the left ventricle via the mitral valve and inflated to produce systolic and diastolic pressures of 80-120 and 4-12 mm Hg, respectively.

Hearts were randomly distributed into 6 experimental groups: control (11 mM glucose)  $\pm$  native bovine serum albumin (BSA) or glycated serum albumin (BSA<sub>gly</sub>); and high glucose (33 mM)  $\pm$  BSA or BSA<sub>gly</sub> (n=6 rats per group). High glucose perfusions were used to simulate acute hyperglycemia as *ex vivo* Langendorff perfusions are typically performed with 11 mM glucose. Thus the 33 mM dose represents a 3-fold elevation of glucose levels (above normal) within the clinical setting. For the glycation of albumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) was prepared at 40g/L in 1x PBS and filtered. Thereafter a 40% methylglyoxal solution was added to the second part of BSA solution at a final concentration of 10 mM, filtered, dialysis performed and BSA subsequently quantified (0.01 mM in the perfusate).

### ***Ex-vivo* global ischemia and reperfusion**

The isolated rat heart perfusion protocol included a 60 min stabilization period, 20 min global ischemia, followed by 60 min of reperfusion. Contractile parameters assessed included left ventricular developed pressure (LVDP) and the percentage recovery was calculated where reperfusion data points were expressed as a percentage of pre-ischemic values. Ventricular tissues were immediately collected after reperfusion by freeze-clamping in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular analyses.

### **Ex-vivo regional ischemia and reperfusion**

We also evaluated the effects of BSA and BSA<sub>gly</sub> on infarct size (20 min regional ischemia followed by 2 hr reperfusion); infarct size and area-at-risk were determined as described before (242,243)].

### **Measurement of intracellular E3 ligases, oxidative stress, inflammation**

Protein isolation and immunoblotting were performed with representative markers for: a) E3 ligases (ubiquitin-proteasome system [UPS]); Muscle RING Finger 1 (MURF1; Abcam, Cambridge MA) and muscle atrophy F-box (MAFbx; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA); b) oxidative stress: superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, SOD2; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA); c) inflammation: tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis MO), and inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis MO); and d) apoptosis: apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC; Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Western blots were quantified by densitometric analysis and  $\beta$ -actin (Cell Signaling, Danvers MA) employed as a loading control as described (243)].

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed by the Mann Whitney t-test, or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey–Kramer *post hoc* test (GraphPad Prism v5, San Diego CA). Values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

Figure 1A shows that hearts exposed to high glucose conditions have decreased cardiac contractile function following ischemia reperfusion vs. hearts under baseline glucose conditions. Furthermore, neither BSA nor BSA<sub>gly</sub> treatment caused significant effects on heart function in response to ischemia-reperfusion under control conditions (11 mM glucose) (Fig 1B and C). However, under high glucose conditions, BSA administration improved functional recovery vs. BSA<sub>gly</sub> with a % LVDP recovery of  $36 \pm 7$  vs.  $25 \pm 4$ , respectively. A similar trend was observed with infarct sizes where BSA decreased infarct size vs. controls ( $59 \pm 2\%$ ) ( $p < 0.05$ ) (high glucose exposure) (Fig 2). However, this protective effect was lost with glycation as BSA<sub>gly</sub> further increased infarct size ( $66 \pm 3\%$ ).

Additionally, BSA<sub>gly</sub> administration resulted in higher AGE formation with ischemia-reperfusion under control and high glucose conditions (Fig 3A). High glucose exposure also triggered UPS activation as MURF1 and MAFbx expression were elevated (Figs 3B and 3C). BSA treatment diminished MURF1 expression ( $p < 0.05$  vs. controls), although this effect was not significant for MAFbx. By contrast, MAFbx expression remained higher with BSA<sub>gly</sub> administration (Fig 3C). High glucose with ischemia-reperfusion also elicited increased inflammation, i.e. higher and lower myocardial TNF- $\alpha$  and I $\kappa$ B $\alpha$  expression levels, respectively (Figs 4A and 4B). BSA treatment blunted this response and augmented myocardial antioxidant and anti-apoptotic status (Figs 4C and Fig 5A-B). BSA<sub>gly</sub> was unable, however, to attenuate the inflammatory response and did not enhance antioxidant capacity under such conditions.

## Discussion

This study revealed impaired cardiac function with ischemia-reperfusion under acute hyperglycemic conditions together with enhanced myocardial UPS, AGE and inflammatory responses. These data are consistent with our previous findings where higher cardiac UPS under similar experimental conditions lowered cardiac function together with increased oxidative stress, inflammation and cell death (244)]. Moreover, partial UPS inhibition counteracted these effects and elicited cardioprotection with ischemia-reperfusion (245)]. We also recently proposed that higher oxidative stress under such conditions plays a central role by triggering damaging downstream effects, i.e. increasing AGE that can also fuel inflammation and apoptosis (239)]. The current findings establish that BSA treatment under such conditions offered cardioprotection by augmenting antioxidant capacity while lowering UPS activation. The precise mechanism(s) whereby such changes occur remain unknown although it is likely that BSA exerts intracellular antioxidant effects. In support, albumin taken up by target cells can elicit antioxidant effects [reviewed in (237)]. However, it is unclear whether this is the case for cardiomyocytes, although albumin can be taken up by endothelial cells (237)].

This study also demonstrates that albumin's cardioprotective effects are lost when modified by glycation. In support, glycated albumin abolished preconditioning-mediated cardioprotection with the receptors of AGE (RAGE) implicated in this process (246)]. Our data also show that the UPS remained activated (in part) together with increased inflammation and higher AGE levels when hearts were treated with BSA<sub>gly</sub>. There are at least two possibilities whereby detrimental effects occur in this instance: 1) glycated albumin is still taken up by target cells but cannot exert its usual intracellular antioxidant role due to the structural modifications and/or 2) glycated albumin binds to RAGE on target cells and trigger downstream effects to increase oxidative stress, AGE generation and inflammation (247)].

## **Conclusions**

In summary, this study established that glycation abolished albumin-mediated cardioprotection with ischemia-reperfusion under high glucose conditions and this centers around the loss of antioxidant capacity and increased AGE generation.

## **Conflict of interest**

The authors hereby confirm that no conflict of interests and no competing financial interests exist.



## References

1. IDF DIABETES ATLAS. 2013;Sixth edition. Available from: [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)
2. Institut de veille sanitaire (France). Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France: synthèse épidémiologique. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2010.
3. Grimaldi A. Traité de diabétologie. MÉDECINE SCIENCES FLAMMARION; 2009.
4. Usher-Smith JA, Thompson M, Ercole A, Walter FM. Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review. *Diabetologia*. 2012 Nov;55(11):2878–94.
5. DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2006 Aug;23(8):857–66.
6. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015 Jun 25;6(6):850–67.
7. Le diabète à La Réunion. *Obs Régional Santé*. 2015 Mai;
8. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1998 Jul;15(7):539–53.
9. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet Lond Engl*. 2009 May 23;373(9677):1789–97.
10. Groupe d' étude de l' OMS sur la prévention du diabète sucré (1992 : Genève, Switzerland), World Health Organization. La prévention du diabète sucré : rapport d' un groupe d' étude de l' OMS [Internet]. Genève : Organisation mondiale de la Santé; 1994. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/40118>
11. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014 Oct 28;224C:164–75.
12. Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *MS Rev [Internet]*. 2006 [cited 2015 Oct 13]; Available from: <http://ipubli-inserm.inist.fr/handle/10608/5731>
13. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875–80.
14. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A-F, Teixeira M, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev*. 2014 Apr 9;114(7):3854–918.
15. Afanas'ev I. Mechanisms of Superoxide Signaling in Epigenetic Processes: Relation to Aging and Cancer. *Aging Dis*. 2015 Jun 1;6(3):216–27.
16. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext; 2007. 1396 p.

17. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2014 Feb 23;2:535–62.
18. Bretón-Romero R, Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 2014 Mar 1;2:529–34.
19. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2005 Jan 17;1703(2):93–109.
20. Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes Biochim L'Actualité Chim* Novembre-Déc 2003. 2003;91–6.
21. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Feb;29(1):89–95.
22. Sanz A, Stefanatos RKA. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr Aging Sci.* 2008 Mar;1(1):10–21.
23. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999 Aug;31(4):347–66.
24. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(5):780–7.
25. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36027–31.
26. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, et al. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J.* 2004 Apr 15;379(Pt 2):359–66.
27. KOCEIR E. ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET BIOENERGETIQUES DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABETE: Rôle de la mitochondrie. [cited 2015 Oct 10]; Available from: <http://www.biologie.50webs.com/Download/Aspects%20physiopath%20et%20bioenreg%20du%20stress%20oxydant%20diabete%20KOCEIR.pdf>
28. Manucha W, Ritchie B, Ferder L. Hypertension and insulin resistance: implications of mitochondrial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2015 Jan;17(1):504.
29. Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med.* 2006;38(6):389–402.
30. Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):25078–84.

31. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb 1;31(Supplement 2):S170–80.
32. Shao B, Bayraktutan U. Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinase C- $\beta$ I and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biol*. 2014;2:694–701.
33. Thallas-Bonke V, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME. Nox-4 and progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Jan;24(1):74–80.
34. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res*. 2015 Nov;49(11):1308–18.
35. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart. *Circ J*. 2014;78(2):300–6.
36. Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension*. 2003 Aug;42(2):206–12.
37. Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1235–43.
38. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2006 Dec;1763(12):1755–66.
39. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 15;33(6):774–97.
40. Lytvyn Y, Perkins BA, Cherney DZI. Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Can J Diabetes*. 2015 Jun;39(3):239–46.
41. Quan W, Jo E-K, Lee M-S. Role of pancreatic  $\beta$ -cell death and inflammation in diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Sep;15 Suppl 3:141–51.
42. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 10];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4516838/>
43. Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia*. 2013 Feb;56(2):234–41.
44. Riché MD. Micronutrition, santé et performance: Comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition. *De Boeck Supérieur*; 2008. 386 p.

45. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1–85.
46. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 2000 Nov;50(4-5):279–89.
47. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1997 Jun;11(7):526–34.
48. Favier A. Le stress oxydant. *Actual Chim.* 2003;108–15.
49. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70–7.
50. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346–57.
51. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2000;99:15–24.
52. Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Anal Biochem.* 2012 Apr 15;423(2):241–5.
53. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P. Le stress oxydant. *Rev Médicale Liège [Internet].* 2007 [cited 2015 Sep 25];62(10). Available from: <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/8914>
54. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res.* 2006 Sep;47(9):1975–83.
55. Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides.* 2006 Jan;13(1):24–9.
56. Anderson EJ, Katunga LA, Willis MS. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Feb;39(2):179–93.
57. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515–40.
58. Garcia YJ, Rodríguez-Malaver AJ, Peñaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods.* 2005 May 15;144(1):127–35.
59. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.

60. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes--second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radic Res.* 2013 Aug;47 Suppl 1:39–48.
61. Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol.* 2009 Oct;44(10):625–33.
62. Tanito M, Elliott MH, Kotake Y, Anderson RE. Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Oct;46(10):3859–68.
63. Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* 2013;1:145–52.
64. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem [Internet].* 2015 Jun 2 [cited 2015 Oct 14];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451417/>
65. Pflaum M, Epe B. Measuring oxidative DNA damage by alkaline elution, in *Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Course*. In eds. Lunec J., Griffiths H. R., editors. (Chichester: John Wiley & Sons, LTD;); 2000. p. 95–104.
66. Ohshima H, Virág L, Souza J, Yermilov V, Pignatelli B, Masuda M, et al. Detection of Certain Peroxynitrite-Induced DNA Modifications. In: Armstrong D, editor. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols [Internet].* Humana Press; 2002 [cited 2016 Mar 4]. p. 77–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-173-6%3A77>
67. Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J.* 1998 May 15;332 ( Pt 1):251–5.
68. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1999 Mar 15;4:D339–45.
69. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2013 Dec 11;2:170–7.
70. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002 Nov;35(8):627–31.
71. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2011 May 13;12(5):3117–32.
72. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995 Dec;11(4):376–81.

73. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9782–7.
74. Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*. 2015 Jan;56(1):1–7.
75. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res*. 1986 Jul 11;14(13):5321–35.
76. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*. 1970 Jul;50(3):319–75.
77. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)*. 2014;60(4):153–67.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. In: *Free radicals in biology and medicine* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
79. Abou-Seif MA, Youssef A-A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2004 Aug 16;346(2):161–70.
80. Ramakrishna V, Jaikhan R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol*. 2008 Mar;45(1):41–6.
81. Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free Radic Biol Med*. 2003 Jul 15;35(2):133–9.
82. Gil-del Valle L, de la C Milian L, Toledo A, Vilaró N, Tápanes R, Otero MA. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res*. 2005 Apr;51(4):375–80.
83. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2009 Aug;157(7):1097–110.
84. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res*. 2005 Jul;39(7):671–86.
85. Tabatabaei-Malazy O, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. Influence of Ascorbic Acid Supplementation on Type 2 Diabetes Mellitus in Observational and Randomized Controlled Trials; A Systematic Review with Meta-Analysis. *J Pharm Pharm Sci*. 2015 Jan 1;17(4):554–82.
86. Steffner RJ, Wu L, Powers AC, May JM. Ascorbic acid recycling by cultured beta cells: effects of increased glucose metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2004 Nov 15;37(10):1612–21.

87. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 1997 Jun;27(6):484–90.
88. Odum EP, Ejilemele AA, Wakwe VC. Antioxidant status of type 2 diabetic patients in Port Harcourt, Nigeria. *Niger J Clin Pract*. 2012 Mar;15(1):55–8.
89. Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian J Clin Biochem*. 2013 Oct;28(4):314–28.
90. Knekt P, Reunanen A, Marniemi J, Leino A, Aromaa A. Low vitamin E status is a potential risk factor for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med*. 1999 Jan;245(1):99–102.
91. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest*. 1998 Apr;28(4):329–33.
92. Laight DW, Carrier MJ, Änggård EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):457–64.
93. Gaziano JM. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999 Feb;111(1):2–9.
94. Jain SK, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T, Meachum ZD, et al. The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetic patients. *Lipids*. 1996 Mar;31 Suppl:S87–90.
95. Maxwell SR. Antioxidant vitamin supplements: update of their potential benefits and possible risks. *Drug Saf*. 1999 Oct;21(4):253–66.
96. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Sep;16(9):1137–54.
97. Sadowska-Bartosch I, Galiniak S, Bartosz G. Polyphenols protect against protein glycoxidation. *Free Radic Biol Med*. 2014 Oct;75 Suppl 1:S47.
98. Jung KH, Choi HS, Kim DH, Han MY, Chang UJ, Yim S-V, et al. Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. *J Med Food*. 2008 Sep;11(3):429–34.
99. Munir KM, Chandrasekaran S, Gao F, Quon MJ. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Sep 15;305(6):E679–86.
100. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2002 Nov;83(1-2):109–16.

101. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu J-B, Sasaoka T, Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol.* 2004 Aug 26;4:18.
102. Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol.* 2010 Dec;2(6):308–17.
103. Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 2001 Apr;83(3-4):301–10.
104. Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome System: Death of Proteins is Required for Life of Cells. *Cell Transm Newsl.* 2003;19(3):3–9.
105. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer.* 2004 May;4(5):349–60.
106. Pacifici RE, Salo DC, Davies KJ. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radic Biol Med.* 1989;7(5):521–36.
107. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373–428.
108. Muñoz C, San Francisco J, Gutiérrez B, González J. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. *BioMed Res Int [Internet].* 2015 [cited 2015 Sep 30];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452248/>
109. Shang F, Nowell TR, Taylor A. Removal of oxidatively damaged proteins from lens cells by the ubiquitin-proteasome pathway. *Exp Eye Res.* 2001 Aug;73(2):229–38.
110. Reinheckel T, Ullrich O, Sitte N, Grune T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 2000 May 1;377(1):65–8.
111. Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J.* 1998 Nov 1;335 ( Pt 3):637–42.
112. Romanucci M, Della Salda L. Oxidative Stress and Protein Quality Control Systems in the Aged Canine Brain as a Model for Human Neurodegenerative Disorders. *Oxid Med Cell Longev [Internet].* 2015 [cited 2015 Oct 19];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442305/>
113. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10;276(32):30057–63.
114. Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress.



- Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):23787–93.
115. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999 Jan;13(1):23–30.
116. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615–25.
117. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. 1994 Jan;43(1):1–8.
118. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):859–66.
119. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2013;2013:1–13.
120. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):855–64.
121. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058–70.
122. Xia L, Wang H, Goldberg HJ, Munk S, Fantus IG, Whiteside CI. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Feb;290(2):F345–56.
123. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha S, Suzuma K, Way KJ, et al. Activation of vascular protein kinase C- $\beta$  inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(3):691–8.
124. Yan L-J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res*. 2014;2014:1–11.
125. Daniels MC, Ciaraldi TP, Nikoulina S, Henry RR, McClain DA. Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in cultured human skeletal muscle cells: relationship to glucose disposal rate in control and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects and regulation by glucose and insulin. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1235–41.
126. Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, McClain DA. Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes*. 2000 Sep;49(9):1492–9.
127. Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*. 2013 Aug;10(4):365–80.

128. Semba RD, Huang H, Luttly GA, Van Eyk JE, Hart GW. The Role of O-GlcNAc Signaling in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Proteomics Clin Appl*. 2014 Apr;8(0):218–31.
129. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2000 Sep;77:S13–8.
130. Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL. Les produits de glycation avancée (AGE): de nouvelles toxines? *Néphrologie*. 2002;23(7):349–57.
131. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):238–43.
132. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6474–9.
133. Maessen DEM, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2015 Jun;128(12):839–61.
134. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006 Apr;366(1-2):190–5.
135. Hartog JWL, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007 Dec;9(12):1146–55.
136. Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:534873.
137. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411–29.
138. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 1992 Jul 25;267(21):14987–97.
139. Pollreisz A, Hudson BI, Chang JS, Qu W, Cheng B, Papapanou PN, et al. Receptor for advanced glycation endproducts mediates pro-atherogenic responses to periodontal infection in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2010 Oct;212(2):451–6.
140. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013 Jul 1;94(1):55–68.

141. Gillery P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. *J Société Biol.* 2001;195(4):387–90.
142. Grimm S, Ott C, Hörlacher M, Weber D, Höhn A, Grune T. Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. *Biochem J.* 2012 Nov 15;448(1):127–39.
143. Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):15888–93.
144. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med Berl Ger.* 2005 Nov;83(11):876–86.
145. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Sep;7(9):526–39.
146. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 10;101(32):11767–72.
147. Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 12;103(37):13801–6.
148. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Jan;294(1):C145–52.
149. Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM, et al. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4931–5.
150. Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 May;19(5):1333–9.
151. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett.* 2003 Feb 27;537(1-3):85–90.
152. Horiuchi S, Unno Y, Usui H, Shikata K, Takaki K, Koito W, et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:671–5.

153. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Joseph KS, Wa C, DeBolt E, et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2013 Oct 21;0:64–76.
154. Roohk HV, Zaidi AR. A Review of Glycated Albumin as an Intermediate Glycation Index for Controlling Diabetes. *J Diabetes Sci Technol Online*. 2008 Nov;2(6):1114–21.
155. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
156. Halliwell B. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*. 1988 Feb 15;37(4):569–71.
157. Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Jan 30;869(2):119–27.
158. Baraka-Vidot J, Planesse C, Meilhac O, Militello V, van den Elsen J, Bourdon E, et al. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 May 19;54(19):3051–62.
159. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 May;76(2):236–44.
160. Unoki H, Yamagishi S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):987–9.
161. Nihar Ranjan Singh PR. Identification of Up-Regulated Low Molecular Weight Proteins in Human Adipocytes Treated with Glycoxidized Albumin. *Open Obes J*. 2010;2:110–5.
162. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol Off J Korean Physiol Soc Korean Soc Pharmacol*. 2014 Feb;18(1):1–14.
163. Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord*. 2014 Apr 7;13:49.
164. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc*. 2000 Oct;100(10):621–34.
165. Jeffcoate SL. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2004 Jul;21(7):657–65.
166. Kosecki SM, Rodgers PT, Adams MB. Glycemic monitoring in diabetics with sickle cell plus beta-thalassemia hemoglobinopathy. *Ann Pharmacother*. 2005 Sep;39(9):1557–60.
167. Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J*. 2010;57(9):751–62.

168. Hashimoto K, Osugi T, Noguchi S, Morimoto Y, Wasada K, Imai S, et al. A1C but not serum glycated albumin is elevated because of iron deficiency in late pregnancy in diabetic women. *Diabetes Care*. 2010 Mar;33(3):509–11.
169. Cohen MP. Perspective: measurement of circulating glycated proteins to monitor intermediate-term changes in glycaemic control. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc*. 1992 Dec;30(12):851–9.
170. Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin Chem*. 1987 Dec;33(12):2153–63.
171. Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1830(6):3532–41.
172. Syrový I. Glycation of albumin: reaction with glucose, fructose, galactose, ribose or glyceraldehyde measured using four methods. *J Biochem Biophys Methods*. 1994 Mar;28(2):115–21.
173. Amornrit W, Santiyanont R. Effect of *Amaranthus* on Advanced Glycation End-Products Induced Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Gene Expression in SH-SY5Y Cells. *Molecules*. 2015 Sep 18;20(9):17288–308.
174. Serban AI, Stanca L, Geicu OI, Dinischiotu A. AGEs-Induced IL-6 Synthesis Precedes RAGE Up-Regulation in HEK 293 Cells: An Alternative Inflammatory Mechanism? *Int J Mol Sci*. 2015 Aug 25;16(9):20100–17.
175. Wang B, P. CC, Pippin JJ. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014 Mar;10(2):131–45.
176. Coleman DL, Hummel KP. Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice. *Diabetologia*. 1974 Nov;10(1):607–10.
177. Belke D, Severson D. Diabetes in Mice with Monogenic Obesity: The db/db Mouse and Its Use in the Study of Cardiac Consequences. In: Joost H-G, Al-Hasani H, Schürmann A, editors. *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Humana Press; 2012 [cited 2015 Oct 18]. p. 47–57. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7_4)
178. Allen TJ, Cooper ME, Lan HY. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy. *Curr Atheroscler Rep*. 2004 May;6(3):197–202.
179. Han KL, Choi JS, Lee JY, Song J, Joe MK, Jung MH, et al. Therapeutic potential of peroxisome proliferators--activated receptor-alpha/gamma dual agonist with alleviation of endoplasmic reticulum stress for the treatment of diabetes. *Diabetes*. 2008 Mar;57(3):737–45.
180. Jafar-Mohammadi B, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes mellitus and obesity--a review. *Ann Med*. 2008;40(1):2–10.

181. Berglund O, Frankel BJ, Hellman B. Development of the insulin secretory defect in genetically diabetic (db/db) mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978 Mar;87(3):543–51.
182. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):727–35.
183. Solano MP, Goldberg RB. Lipid Management in Type 2 Diabetes. *Clin Diabetes*. 2006 Jan 1;24(1):27–32.
184. Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases*. CRC Press; 1997. 586 p.
185. OMS | Obésité [Internet]. WHO. [cited 2015 Oct 24]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/fr/>
186. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 26;16(1):378–400.
187. Freedman DS, Wang J, Thornton JC, Mei Z, Sopher AB, Pierson RN, et al. Classification of body fatness by body mass index-for-age categories among children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Sep;163(9):805–11.
188. Sikaris KA. The clinical biochemistry of obesity. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem*. 2004 Aug;25(3):165–81.
189. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med*. 2009 Nov;121(6):21–33.
190. Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH, et al. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obes Silver Spring Md*. 2008 Jun;16(6):1161–77.
191. Kelishadi R. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiol Rev*. 2007;29:62–76.
192. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 23];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468292/>
193. Démarchez M. Biologie de la peau [Internet]. <http://biologiedelapeau.fr>. 2015 [cited 2015 Oct 23]. Available from: <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article28>
194. Tarnus E, Bourdon E. Anthropometric evaluations of body composition of undergraduate students at the University of La Réunion. *Adv Physiol Educ*. 2006 Dec 1;30(4):248–53.
195. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol*. 2006 Aug;329(8):570–7; discussion 653–5.

196. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obes Silver Spring Md*. 2006 Aug;14 Suppl 5:242S – 249S.
197. Scherer PE. Adipose Tissue From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*. 2006 Jun 1;55(6):1537–45.
198. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004 Sep;30(4):294–309.
199. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol*. 2006 Aug;329(8):598–607; discussion 653–5.
200. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793–801.
201. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1;51(7):1289–301.
202. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec;25(3-4):283–92.
203. Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, Nagai R, Carson JA, Thorpe SR, et al. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. *J Biol Chem*. 2009 Sep 18;284(38):25772–81.
204. Singh NR, Rondeau P, Hoareau L, Bourdon E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res*. 2007 Oct;41(10):1078–88.
205. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. 2015 Oct 10;6(13):1246–58.
206. Matheus AS de M, Tannus LRM, Cobas RA, Palma CCS, Negrato CA, Gomes M de B. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens*. 2013;2013:653789.
207. Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Wainstein MV, Boff W, Puñales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes*. 2015 Jun 10;6(5):679–92.
208. Makita T, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Numano F. Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein (LDL) uptake into macrophages in patients with diabetes mellitus. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 1999 Jun;18(2):149–53.
209. Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):1038–45.

210. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015;58(5):886–99.
211. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;947:199–205; discussion 205–6.
212. Rosenstock J, Challis P, Strowig S, Raskin P. Improved diabetes control reduces skeletal muscle capillary basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1988 Feb 19;4(3):167–75.
213. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15918–53.
214. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta*. 1983 Jan 7;127(1):87–95.
215. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.
216. Abid MR, Spokes KC, Shih S-C, Aird WC. NADPH Oxidase Activity Selectively Modulates Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways. *J Biol Chem*. 2007 Nov 30;282(48):35373–85.
217. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156–9.
218. Koeck T, Willard B, Crabb JW, Kinter M, Stuehr DJ, Aulak KS. Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic Biol Med*. 2009 Apr 1;46(7):884–92.
219. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez MV. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest Anim Endocrinol*. 2016 Jan;54:76–84.
220. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Jun 23;13:103.
221. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol*. 2014 Sep 1;222(3):R113–27.
222. Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Sep 1;23(7):597–612.
223. Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Investig Med Médecine Clin Exp*. 1995 Aug;18(4):275–81.



224. Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res*. 2010 Feb 19;106(3):463–78.
225. Divald A, Powell SR. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 1;40(1):156–64.
226. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635–43.
227. Youn J-Y, Siu KL, Lob HE, Itani H, Harrison DG, Cai H. Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes*. 2014 Jul;63(7):2344–55.
228. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752–61.
229. Yamagishi S-I, Nakamura N, Suematsu M, Kaseda K, Matsui T. Advanced Glycation End Products: A Molecular Target for Vascular Complications in Diabetes. *Mol Med Camb Mass*. 2015;21 Suppl 1:S32–40.
230. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194–222.
231. Wu C-H, Huang H-W, Huang S-M, Lin J-A, Yeh C-T, Yen G-C. AGE-induced interference of glucose uptake and transport as a possible cause of insulin resistance in adipocytes. *J Agric Food Chem*. 2011 Jul 27;59(14):7978–84.
232. Koektuerk B, Aksoy M, Horlitz M, Bozdog-Turan I, Turan RG. Role of diabetes in heart rhythm disorders. *World J Diabetes*. 2016 Feb 10;7(3):45–9.
233. Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, Haskó G, Ferdinandy P, Pacher P. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1852(2):232–42.
234. Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Sep;31(9):1653–62.
235. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
236. Bourdon E, Blache D. The Importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(2):293–311.
237. Francis GL. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*. 2010 Jan;62(1):1–16.
238. Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Sep;31(9):1653–62.

239. Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H153–73.
240. Luoma P V, Näyhä S, Sikkilä K, Hassi J. High serum alpha-tocopherol, albumin, selenium and cholesterol, and low mortality from coronary heart disease in northern Finland. *J Intern Med*. 1995 Jan;237(1):49–54.
241. Phillips A, Gerald Shaper A, Whincup P. ASSOCIATION BETWEEN SERUM ALBUMIN AND MORTALITY FROM CARDIOVASCULAR DISEASE, CANCER, AND OTHER CAUSES. *The Lancet*. Elsevier; 1989 Dec 16;334(8677):1434–6.
242. Mapanga RF, Joseph D, Symington B, Garson K-L, Kimar C, Kelly-Laubscher R, et al. Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2014;210:546–64.
243. Mapanga R, Rajamani U, Dlamini N, Zungu-Edmondson M, Kelly-Laubscher R, Shafiullah M, et al. Oleanolic Acid: A Novel Cardioprotective Agent that Blunts Hyperglycemia-induced Contractile Dysfunction. *PloS One*. 2012;7(10):e47322.
244. Pye J, Ardeshipour F, McCain A, Bellinger D a, Merricks E, Adams J, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Mar;284(3):H919–26.
245. Adams B, Mapanga RF, Essop MF. Partial inhibition of the ubiquitin-proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion in the presence of high glucose. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:94.
246. Robinet A, Alouane L, Hoizey G, Millart H. Advanced-glycation end products (AGEs) derived from glycated albumin suppress early beta1-adrenergic preconditioning. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Feb;21(1):35–43.
247. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie*. 2011 Apr;93(4):645–58.

Figure

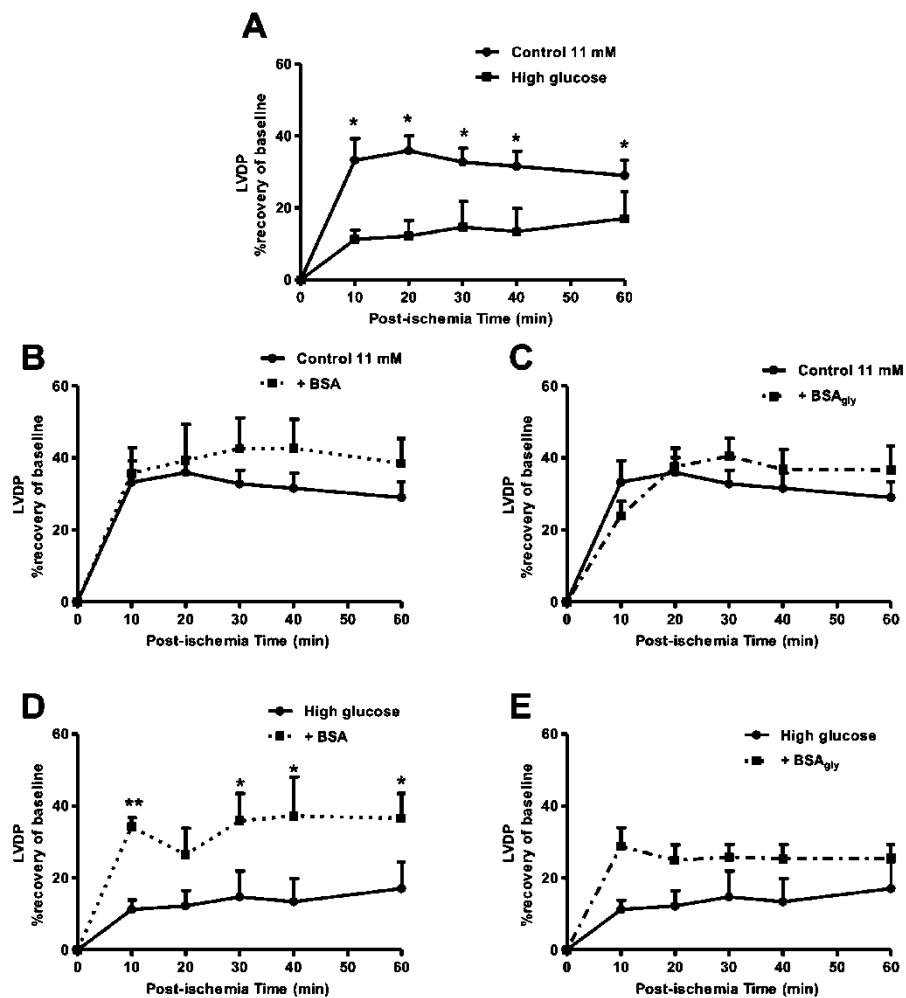
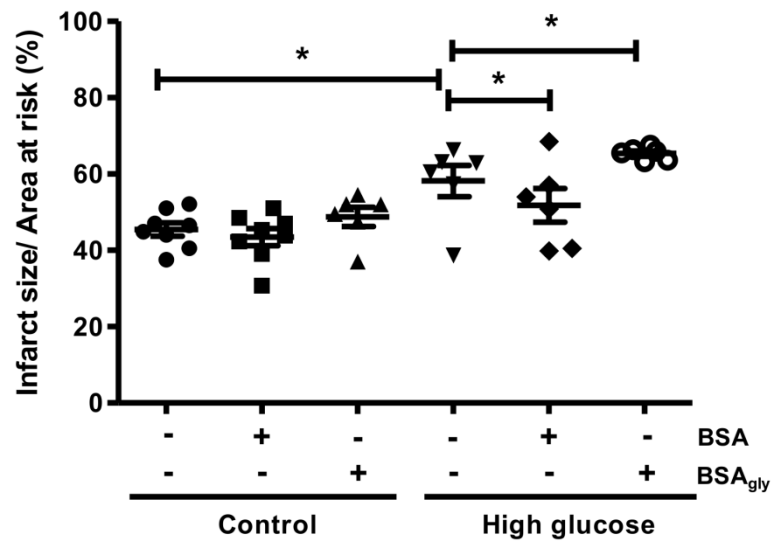


Figure 1

Cardiac contractile function following ischemia and reperfusion (global ischemia) as indicated by % LVDP recovery. A) under baseline and acute high glucose conditions; under baseline conditions with B) native bovine serum albumin (BSA) vs. C) glycated albumin (BSA<sub>gly</sub>) and under high glucose conditions D) native bovine serum albumin

(BSA) vs. E) glycated albumin (BSA<sub>gly</sub>). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6).

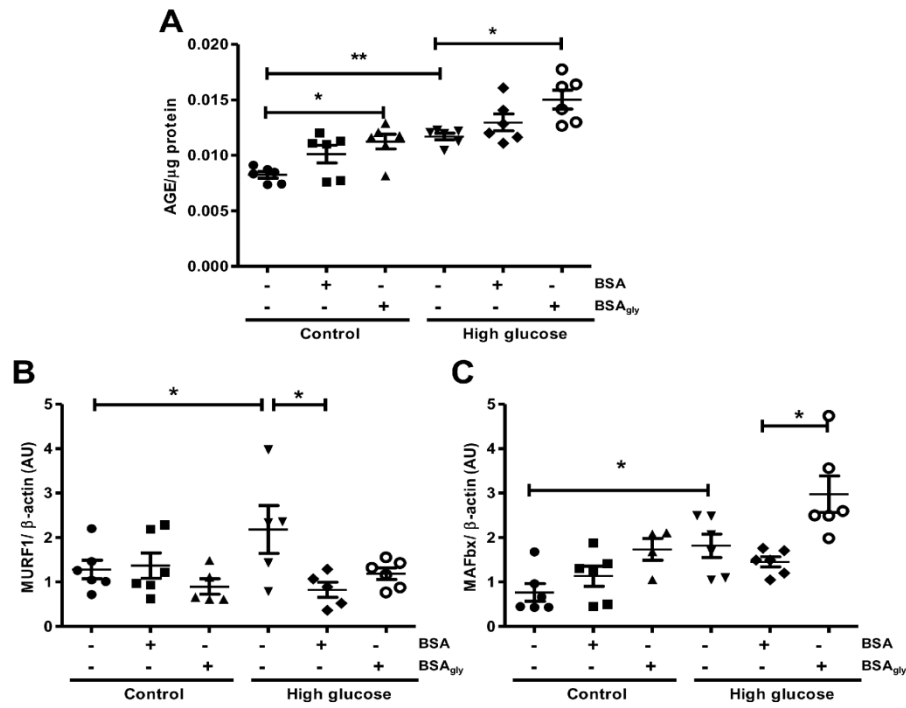
\*p<0.05; \*\*p<0.01 vs. respective controls and # p<0.05 vs. BSA



**Figure 2**

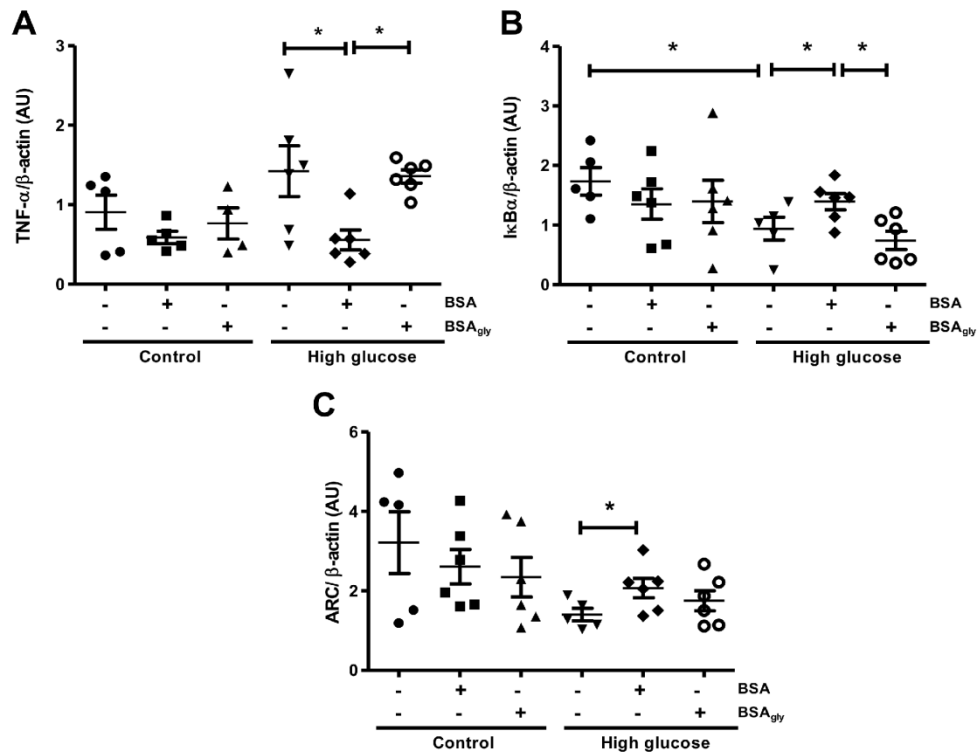
The effects of native bovine serum albumin (BSA) vs. glycated albumin (BSA<sub>gly</sub>) on infarct sizes (regional ischemia). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6).

\*p<0.05 vs. respective controls.



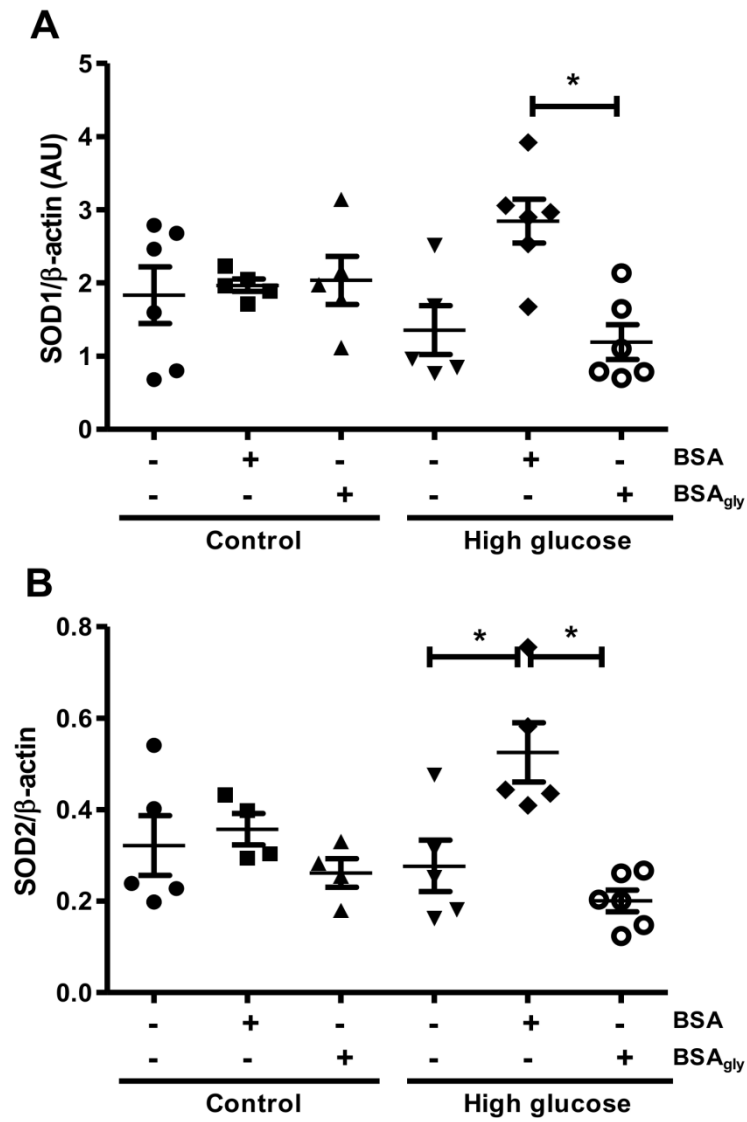
**Figure 3**

The effects of native bovine serum albumin (BSA) vs. glycated albumin (BSA<sub>gly</sub>) on A) formation of cardiac AGE, and protein expression of B) MURF1 and C) MAFbx. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05; \*\*p<0.01 vs. respective controls.



**Figure 4**

Albumin glycation following ischemia-reperfusion under acute high glucose conditions results in increased A) TNF- $\alpha$ , B) I $\kappa$ B $\alpha$  and E) ARC protein expression levels. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05 vs. respective controls.



**Figure 5**

Albumin glycation following ischemia-reperfusion under acute high glucose conditions results in decreased C) SOD1 and D) SOD2 protein expression levels. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05 vs. respective controls.

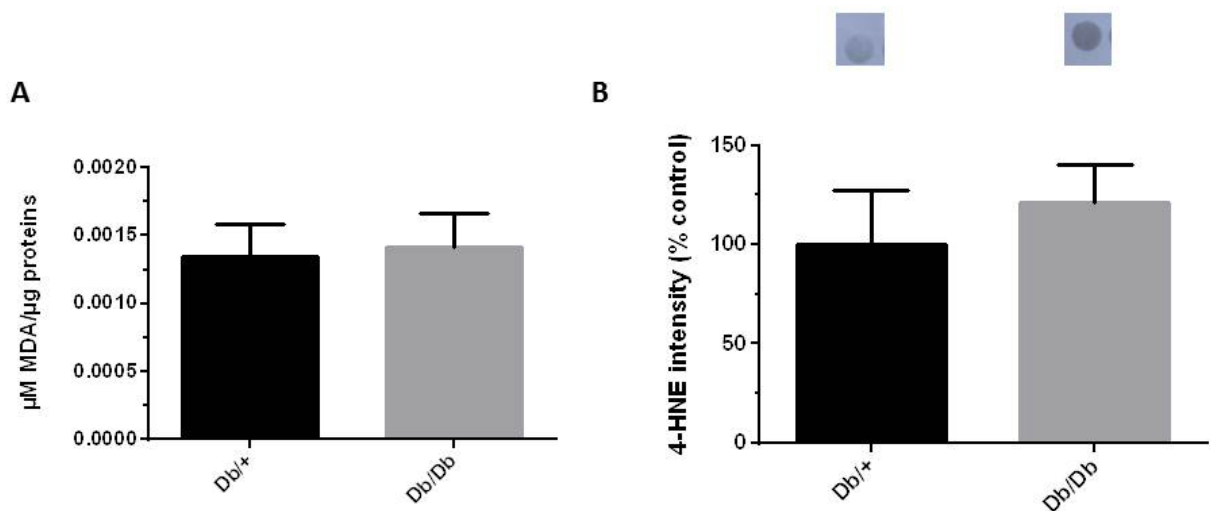




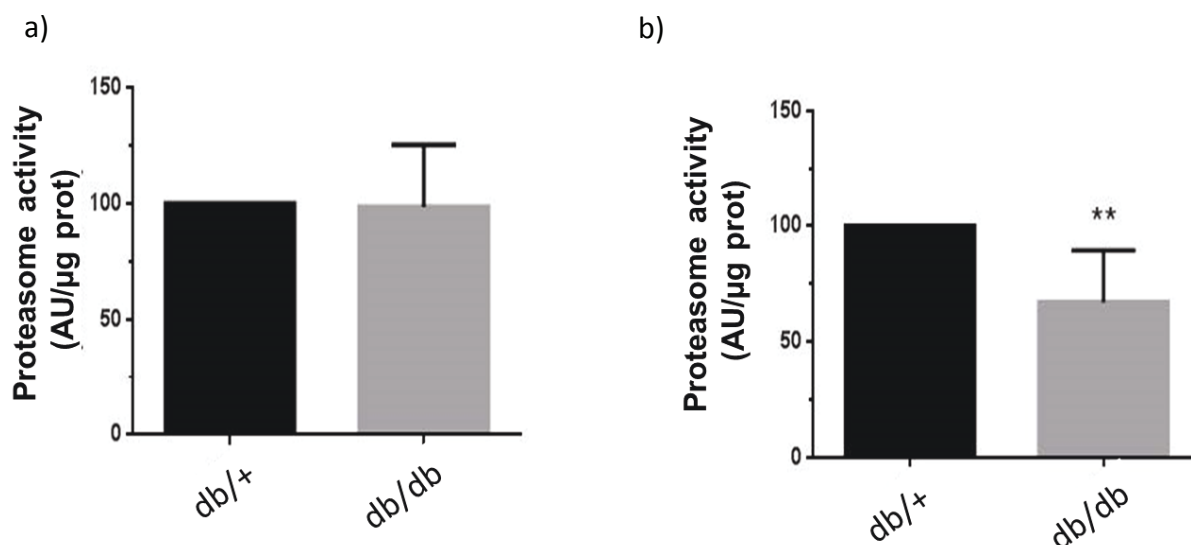
## Discussion

L'albumine, est une protéine, possédant des capacités anti-oxydante et anti-inflammatoire. Dans la première étude, il a été mis en évidence que l'albumine, après glycation, perdait ses propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire. De plus, l'albumine possède des capacités de cardio-protection, permettant un meilleur recouvrement des capacités cardiaques ainsi qu'une diminution de la taille de la zone infarctée, en condition d'hyperglycémie. Ses capacités de cardio-protection sont perdues lorsque l'albumine est glyquée.

Chez les souris db/db, on observe une légère augmentation de l'expression du 4-HNE, bien que non significative (**Figure 25**). En ce qui concerne les activités du protéasome, on observe une diminution de l'activité de type trypsine uniquement (**Figure 26**). Ces résultats ont déjà été observés par d'autres équipes de recherche.



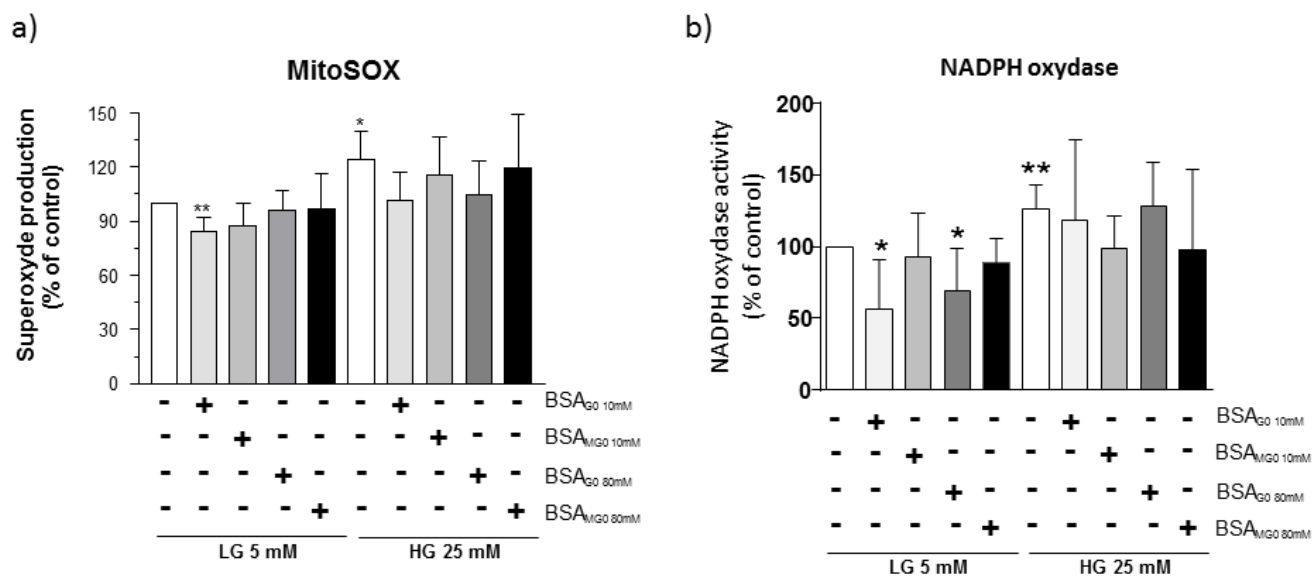
**Figure 25. Mesure du taux de produit issu de la peroxydation lipidique du cœur de souris db/db. a) Mesure du taux de MDA. (N=5). b) mesure du taux de 4-HNE par dot blot (N=6).**



**Figure 26. Activité protéolytique du protéasome chez les souris db/db.** a) mesure de l'activité LLVY (N=8) ; b) mesure de l'activité LSTR. \*\*  $p < 0.01$  vs db/+. Un-paired t-test (N=7-8).

Ces résultats mettent en évidence un dysfonctionnement d'un des principaux systèmes de défense de l'organisme, au niveau cardiaque, dans le cadre de la pathologie diabétique.

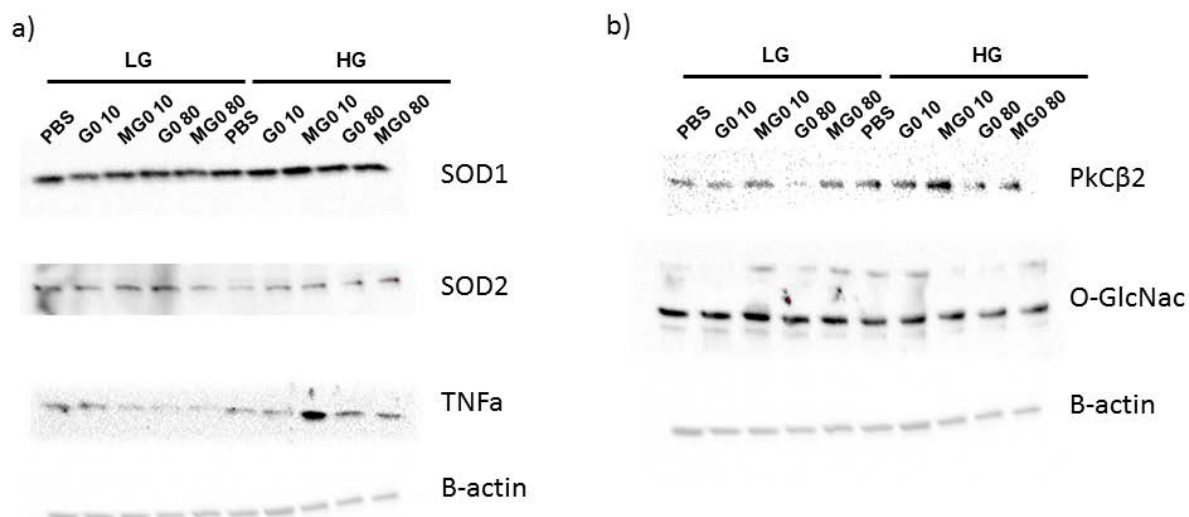
Ensuite, concernant les résultats obtenus sur les cellules H9C2, ceux-ci ont montré une augmentation du stress oxydant, traduit par une augmentation de la production d'anion superoxyde, ainsi qu'une activation de la NADPH oxydase, en condition d'hyperglycémie (**Figure 27**). La NADPH oxydase est la principale source de production de l'anion superoxyde au niveau cardiaque.



**Figure 27. Production de ROS et activité NADPH oxydase.** a) Analyse de la production de Superoxyde par cytométrie de flux \*  $p < 0.05$  vs LG 5 mM, \*\*  $p < 0.01$  vs LG 5 mM. Un-paired  $t$ -test ( $N=4$ ). b) Activité NADPH oxydase. \*  $p < 0.05$  vs LG 5 mM, \*\*  $p < 0.01$  vs LG 5 mM. Un-paired  $t$ -test ( $N=5-6$ ).

De plus, en condition de normoglycémie, l'activité de la NADPH oxydase est diminuée en présence d'albumine native. Cet effet est perdu en présence d'albumine glyquée.

Par la suite, je me suis intéressée à la présence d'une réponse anti-oxydante ainsi qu'à la présence de marqueur pro-inflammatoire tel que  $\text{TNF}\alpha$  (**Figure 28**). Ces résultats sont des résultats préliminaires et d'autres investigations seront nécessaires pour pouvoir conclure quant à un possible effet des traitements employés sur l'expression des superoxydes dismutases et de  $\text{TNF}\alpha$ .



**Figure 28. Analyse de l'expression de protéines par Western Blot.** a) Expression d'enzymes anti-oxydantes (SOD1 et SOD2) et de marqueur pro-inflammatoire (TNFα) ; b) Expression de marqueurs de voie activé par l'hyperglycémie : PkCβ2 et les protéines OGlcNac. (N=1). Les cellules ont été traitées en condition d'hyperglycémie (25 mM) et/ou en présence d'albumine glyquée (10 ou 80 μM) pendant 24 heures.

Enfin, j'ai procédé à l'analyse de certains marqueurs des NOGPs tel que PkCβ2, ainsi que la présence de protéine O-GlcNac (**Figure 28**). Cependant, des analyses complémentaires sont nécessaires pour conclure sur un possible effet des traitements sur la modulation de ces voies de signalisation.

## **VI. Conclusion et perspectives**

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai voulu mettre en avant le rôle du stress oxydant dans le cadre de la pathologie diabétique. Pour ce faire, j'ai procédé à la glycation de l'albumine. Le stress oxydant a été induit ici principalement par l'hyperglycémie mais aussi par l'albumine glyquée.

Dans la première étude, nous avons montré que le stress oxydant associé à l'hyperglycémie joue un rôle dans le dysfonctionnement des cellules SW872, notamment de par l'augmentation du taux de protéine oxydées et une dérégulation des activités du protéasome. Nous avons montré également, dans ces conditions, la présence de récepteur RAGE et CD36 à la surface de ces cellules. Les récepteurs RAGE et CD36 fixent les AGE entraînant une augmentation du stress oxydant.

Dans la deuxième étude, j'ai étudié les activités du protéasome au niveau hépatique dans le cadre de la pathologie diabétique en utilisant comme modèle les souris obèses et diabétiques, db/db. Nous avons montré une altération des activités du protéasome. Le protéasome étant un gros complexe protéique, il peut être soumis à des phénomènes d'oxydation ou de glycation, ce qui va altérer son fonctionnement et entraîner l'accumulation de protéines oxydées. De plus, nous avons mis en évidence que le sérum de souris db/db avaient une concentration de protéines oxydées ou glyquées plus importante que celui de souris contrôle. L'albumine étant la protéine la plus abondante du sérum, il est fort probable qu'elle soit la plus touchée par ces phénomènes d'oxydation et de glycation.

Dans la troisième étude, je me suis focalisée sur l'impact du stress oxydant sur le tissu adipeux. Chez les souris db/db, une augmentation du stress oxydant a été mise en évidence par la mesure d'une augmentation des ROS et la présence de marqueurs de peroxydation lipidique. De plus, nous avons noté une dérégulation des systèmes antioxydants et des systèmes de défense en particulier en ce qui concerne les activités du protéasome. Cependant aucun résultat n'a permis de mettre en évidence l'implication des AGE dans le dysfonctionnement adipocytaire, au niveau du TAE de souris db/db. En effet, on n'observe aucune modulation de l'expression d'un des principaux récepteurs aux AGE, le récepteur RAGE, chez les souris diabétiques. Des analyses complémentaires sont donc nécessaires

pour démontrer l'implication des AGE dans le dysfonctionnement des adipocytes, dans le cadre de la pathologie diabétique.

Dans un deuxième temps, j'ai travaillé sur l'impact du stress oxydant induit par l'hyperglycémie et par l'albumine glyquée, au niveau d'un modèle de cellules pré-adipocytaire : les cellules 3T3L1. La présence d'albumine glyquée et l'hyperglycémie entraînent la production d'espèces réactives de l'oxygène. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucun effet n'a été observé concernant une possible activation du protéasome ou installation d'un statut inflammatoire. Même si il a été mis en évidence une possible implication des AGE dans l'induction d'un stress oxydant, d'autres investigations sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication des AGE dans le dysfonctionnement adipocytaire, dans le cadre du diabète. Dans ce but, des mesures d'activité du protéasome mais aussi des mesures du taux de cytokines pro-inflammatoire pourront être effectuées après des temps de traitement plus long qui seront plus représentatif de ce qui est observé dans la pathologie diabétique. Enfin, afin de mieux comprendre par quels mécanismes les AGE peuvent agir, il conviendrait de regarder leur interaction avec leurs récepteurs (RAGE, CD36, AGER). Pour cela, il est possible de bloquer l'interaction des AGE avec le récepteur RAGE, grâce à l'utilisation de RAGE recombinant ou d'anticorps anti-RAGE, et d'observer les effets sur la balance redox.

Dans la quatrième étude, je me suis focalisée sur l'impact du stress oxydant au niveau du tissu cardiaque et des cellules cardiaques H9C2. Dans une première partie, l'impact de l'albumine glyquée au niveau de cœur de rat ischémié reperfusé, a été étudié. Lors de ce travail, il a été mis en évidence que l'albumine perdait ses capacités anti-oxydantes et protectrices lorsqu'elle était soumise à des phénomènes de glycation.

Dans une deuxième partie, j'ai travaillé sur le modèle de souris db/db. Le travail au niveau du cœur de souris db/db est encore en cours et seuls quelques résultats ont pu être obtenus. Ainsi, un dérèglement au niveau des activités du protéasome a pu être mis en évidence. Un travail supplémentaire concernant l'impact du diabète sur l'équilibre de la balance redox, doit être effectué. Ainsi, il serait judicieux de regarder les activités des principales enzymes anti-oxydantes mais aussi la présence de marqueur pro-oxydant. De

plus, il serait intéressant d'étudier l'interaction des AGE avec leur récepteur afin de mieux comprendre l'implication des AGE dans le cadre de la pathologie diabétique.

Dans la dernière partie, j'ai travaillé sur le modèle cellulaire H9C2. Les cellules H9C2 sont des cellules cardiaques de rat. Elles ont été soumises à un stress oxydant induit par l'albumine glyquée et par l'hyperglycémie. Ici, l'hyperglycémie a entraîné une activation de la NADPH oxydase qui est la principale source de ROS au niveau cardiaque. L'albumine native quant à elle entraîne une diminution de l'activité de la NADPH oxydase. Ensuite, j'ai étudié par Western blot l'expression d'enzymes anti-oxydantes (SOD1 et 2) ainsi que la présence de marqueurs pro-inflammatoires. Les résultats concernant cette partie nécessitent plus d'investigations pour pouvoir être interprétés. De plus il faudrait aussi étudier l'expression des autres enzymes anti-oxydantes telles que la catalase et la GPx, ainsi que la présence de marqueur du stress oxydant (protéines oxydées, AGE, produit de peroxydation lipidique). Enfin, je me suis intéressée à l'activation des NOGPs. Pour cela, j'ai regardé par Western blot l'expression de certains marqueurs de ces voies, en particulier la voie de PkC et la voie des hexoamines. Cependant, ces travaux sont encore à leur début et devraient faire l'objet d'analyses plus poussées.

Au cours de ma thèse, j'ai donc pu utiliser plusieurs modèles afin d'étudier l'impact du stress oxydant lié au diabète. L'hyperglycémie et la présence d'AGE semblent jouer un rôle important dans le dysfonctionnement adipocytaire et cardiaque en perturbant la balance redox et en favorisant l'inflammation. Cependant beaucoup d'analyses restent à effectuer afin de mieux comprendre le rôle des AGE dans les dysfonctionnements cellulaires.



# **Annexes**



**Annexe 1 Autre article issu de mon travail**

**« Cardio-Metabolic effects of HIV protease inhibitors  
(Lopinavir/Ritonavir) » *(Kathleen M.S.E et al. 2013)***



# Cardio-Metabolic Effects of HIV Protease Inhibitors (Lopinavir/Ritonavir)

Kathleen M.S.E. Reyskens<sup>1</sup>, Tarryn-Lee Fisher<sup>1</sup>, Jonathan C. Schisler<sup>2</sup>, Wendi G. O'Connor<sup>2</sup>, Arlin B. Rogers<sup>2</sup>, Monte S. Willis<sup>2</sup>, Cynthia Planesse<sup>3</sup>, Florence Boyer<sup>3</sup>, Philippe Rondeau<sup>3</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>3</sup>, M. Faadiel Essop<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cardio-Metabolic Research Group (CMRG), Department of Physiological Sciences, Stellenbosch University, Stellenbosch 7600, South Africa, <sup>2</sup> McAllister Heart Institute, Department of Pathology & Laboratory Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA, <sup>3</sup> Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO), Plateforme CYRO, Université de La Réunion, Saint Denis de La Réunion, France

## Abstract

Although antiretroviral treatment decreases HIV/AIDS morbidity/mortality, long-term side effects may include the onset of insulin resistance and cardiovascular diseases. However, the underlying molecular mechanisms responsible for highly active antiretroviral therapy (HAART)-induced cardio-metabolic effects are poorly understood. In light of this, we hypothesized that HIV protease inhibitor (PI) treatment (Lopinavir/Ritonavir) elevates myocardial oxidative stress and concomitantly inhibits the ubiquitin proteasome system (UPS), thereby attenuating cardiac function. Lopinavir/Ritonavir was dissolved in 1% ethanol (vehicle) and injected into mini-osmotic pumps that were surgically implanted into Wistar rats for 8 weeks vs. vehicle and sham controls. We subsequently evaluated metabolic parameters, gene/protein markers and heart function (ex vivo Langendorff perfusions). PI-treated rats exhibited increased serum LDL-cholesterol, higher tissue triglycerides (heart, liver), but no evidence of insulin resistance. In parallel, there was upregulation of hepatic gene expression, i.e. acetyl-CoA carboxylase  $\beta$  and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase, key regulators of fatty acid oxidation and cholesterol synthesis, respectively. PI-treated hearts displayed impaired cardiac contractile function together with attenuated UPS activity. However, there was no significant remodeling of hearts exposed to PIs, i.e. lack of ultrastructural changes, fibrosis, cardiac hypertrophic response, and oxidative stress. Western blot analysis of PI-treated hearts revealed that perturbed calcium handling may contribute to the PI-mediated contractile dysfunction. Here chronic PI administration led to elevated myocardial calcineurin, nuclear factor of activated T-cells 3 (NFAT3), connexin 43, and phosphorylated phospholamban, together with decreased calmodulin expression levels. This study demonstrates that early changes triggered by PI treatment include increased serum LDL-cholesterol levels together with attenuated cardiac function. Furthermore, PI exposure inhibits the myocardial UPS and leads to elevated calcineurin and connexin 43 expression that may be associated with the future onset of cardiac contractile dysfunction.

**Citation:** Reyskens KMSE, Fisher T-L, Schisler JC, O'Connor WG, Rogers AB, et al. (2013) Cardio-Metabolic Effects of HIV Protease Inhibitors (Lopinavir/Ritonavir). PLoS ONE 8(9): e73347. doi:10.1371/journal.pone.0073347

**Editor:** Sudhinarayan Gupta, Texas A & M, Division of Cardiology, United States of America

**Received:** May 13, 2013; **Accepted:** July 18, 2013; **Published:** September 30, 2013

**Copyright:** © 2013 Reyskens et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the South African National Research Foundation and Stellenbosch University (MFE), the Conseil Régional de La Réunion and l'Europe (the Jefferson IEB), and a Pilot Fellowship in Academic Medicine (MSW). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mfeessop@sun.ac.za

## Introduction

The human immunodeficiency virus (HIV) has infected over 40 million individuals over the last decade, with more than 5 million residing in sub-Saharan Africa [1,2]. Although highly active antiretroviral therapy (HAART) enhances life expectancy and quality of infected individuals [3,4], there is increased emphasis on HAART-mediated metabolic derangements [5] and its potential risk for cardiovascular diseases (CVD) in the long-term.

Protease inhibitors (PIs) form an integral part of HAART and side-effects include development of dyslipidemia, i.e. greater production of plasma triglycerides and lipids together with an adverse cholesterol profile [6–8]. Together such derangements elicit inflammation, stress the myocardium [9], and may potentially predict the onset of insulin resistance (IR) [10,11] and cardiac dysfunction [11]. PIs are also linked to increased risk for

myocardial infarction [13] and cardiovascular abnormalities [14,15], with many changes resembling coronary artery disease [16]. It is unclear whether metabolic side effects of PIs are independently and/or causally linked with cardiovascular perturbations. Moreover, the effects of PIs *per se* on the heart in this context are also poorly understood. Therefore, an emerging focus is to identify key metabolic and transcriptional pathways that may mediate PI-induced cardio-metabolic pathophysiology. For example, we recently found that rats exposed to 8 weeks of PI treatment displayed cardiac dysfunction [17]. Moreover, PI-treated HIV-infected individuals exhibit elevated reactive oxygen species (ROS) production [18–20] that may trigger the activation of detrimental signaling and cell death pathways [21].

HIV-PIs may also exert unfavorable effects at the gene transcriptional level, e.g. activating sterol regulatory element binding protein (SREBP) [22], a key lipid transcriptional

modulator expressed in major metabolic tissues [23]. Upon activation, SREBP binds to sterol-regulatory-element (SRE)-containing promoter sequences in lipogenic and cholesterologenic genes (e.g. 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase [*hmgcr*]) that ultimately results in the production of cholesterol (high and low density lipoproteins) and sterol components [24]. The ubiquitin-proteasome system (UPS) – responsible for removal of misfolded or damaged proteins – is also implicated in the onset of such metabolic side effects. For example, the PI Ritonavir attenuates chymotrypsin- and trypsin-like activities of the 20S UPS subunit in hepatocytes [25]. As a result, degradation of apolipoprotein B (major determinant of plasma lipid levels) was diminished thus providing a potential mechanism for PI-induced hyperlipidemia [26]. Furthermore, SREBPs are ubiquitinated and degraded by the UPS [27,28] raising the possibility that an inhibition of this system may also contribute to development of dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with PIs. Together this may establish a pro-atherogenic profile and increase the risk for the onset of CVD.

Despite such progress, the underlying molecular mechanisms responsible for HAART-induced cardio-metabolic side effects are poorly understood, and little is known about the earliest events driving this process. Whether these molecular alterations occur as a direct result of PI treatment or through the activation of additional pathways throughout the body at a later stage remain elusive. For the current study, we therefore hypothesized that PI treatment enhances myocardial oxidative stress and concomitantly inhibits the UPS, having a knock-on effect on important downstream regulators such as gap junctions and ion channels essential in cardiac physiology. We also evaluated several non-oxidative glucose metabolic circuits i.e. the polyol pathway, hexosamine biosynthetic pathway (HBP), advanced glycation end products (AGE), and PKC activation since previous work found its activation can elicit the onset of cardio-metabolic complications [29]. Since our previous *ex vivo* rat heart study [17] implicated altered calcium homeostasis in PI-mediated cardiac dysfunction, we further investigated calcium signaling and mitochondrial energetic regulators in an established rat model of chronic PI drug delivery. These data may explain and suggest an association between molecular changes and depressed cardiac contractile function.

## Materials and Methods

**Animal model.** Lopinavir/Ritonavir (Kaletra™, Abbott Laboratories, Abbot Park IL) was crushed and dissolved in a 1% ethanol (vehicle) solution at human steady-state plasma concentration ( $7.1 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ ), sterile filtered and injected into a mini-osmotic pump (Alzet, Cupertino CA). Male Wistar rats (180–220 g) received either: mock surgery (sham), vehicle-, or PI-containing pump for a total of 8 weeks ( $n=8$  per group) as previously described [17]. Food consumption was measured via weekly weighing of the food (in cages) and expressed as average food consumed per rat. All animals were treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Academy of Sciences (NIH publication No. 85–23, revised 1996) and performed with the approval of the Animal Ethics Committee of Stellenbosch University (South Africa).

**Baseline heart function assessment.** After 8 weeks rats were euthanized with pentobarbitone-sodium (10 mg/kg, i.p.) and hearts rapidly excised, weighed and placed into ice-cold Krebs-Henseleit (KH) buffer before cannulation on a Langendorff perfusion rig as previously described [17]. The cannulation and perfusion occurred within <1.5 min of excision for all

hearts. Additional parameters to the ones we have previously published include  $\pm dP/dt$  and heart rate during 60 min of perfusion.

**Histologic and metabolic measurements.** After 8 weeks, harvested tissues (heart, liver, adipose, pancreas and skeletal muscle) were fixed, processed and embedded in paraffin wax whereafter sections were stained with a) hematoxylin and eosin (H & E) for general morphologic evaluation and b) Sirius red for detection of collagen deposits (fibrosis).

In an identical cohort of animals, we evaluated both serum and tissue metabolite levels following PI treatment. After 8 weeks (4–7 days before termination of treatment period) rats underwent a 12–18 h overnight fast whereafter blood was collected from the jugular vein under anesthesia (isoflurane in oxygen, 5% for induction and 3% for maintenance). Serum was isolated from the collected blood and analyzed for: total and LDL cholesterol, free fatty acids (FFA) and triglyceride (TG) levels (NHLS, Tygerberg Hospital, South Africa). We also evaluated the homeostatic model of assessment for insulin resistance (HOMA-IR) – here serum insulin and glucose levels were also determined (PathCare Laboratory, Stellenbosch, South Africa). The HOMA-IR was calculated as follows: (glucose [mg/dL] x fasting insulin [ $\mu\text{U/mL}$ ]/2.43) and the equation used in accordance with the guidelines for HOMA-IR assessment in rodents [30].

Isolated heart and liver tissues were also assessed for: total cholesterol, HDL, LDL/VLDL cholesterol (Abcam, Cambridge MA) and TG content (BioVision, Milpitas CA) according to the manufacturer's instructions.

**Real-time qPCR analysis for gene expression.** Total RNA was isolated from homogenized liver and heart tissues ( $n=8$ ) using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD) according to the manufacturer's protocols as previously described [31,32]. First strand cDNA was made using the iScript™ cDNA synthesis kit (BioRad, Hercules CA) using 200 & 250 ng of RNA from liver, and heart tissue, respectively, and included the Solaris synthetic RNA Spike Control (Thermo Scientific, Waltham MA) to test for reverse transcription and PCR inhibition. Samples that did not show significant inhibition ( $\Delta C_t < 3$  compared to synthetic target alone, 69 of 72 samples) were diluted 20-fold in water and used for gene expression analysis. A total of three samples exhibited inhibition and were not used for qPCR analysis. We evaluated expression of the following genes: acetyl-CoA carboxylase isoforms (*accx*: marker of FA synthesis; *accβ*: marker of FA oxidation); fatty acid synthase (*fasn*: marker of FA synthesis); glycerol-3-phosphate acyltransferase (mitochondrial) (*gpat*: marker of glycerol-lipid synthesis); hydroxyl-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (*hmgcr*: marker of cholesterol synthesis); LDL receptor (*ldlr*: marker of LDL metabolism); SREBP isoforms (*srebpl1/2*: evaluate role of SREBPs); and glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (*gfal1*: HBP marker). For all qPCR reactions, 2  $\mu\text{L}$  of diluted cDNA (range ~2–5 ng of cDNA) was used in technical triplicate reactions using LightCycler® 480 Probes Master mix (Roche, Indianapolis IN) for 5' exonuclease chemistry with primers and probes per manufacturer specifications (Primers [forward/reverse]: *actb* – cccgcgagtagcaacattct/cgtccatcgccgaact; *hprt1* – gaccggctgtcatgtcg/acctgggtcatcactaatac; *pgk1* – ccagatacgaataaccagaaga/gactggctccatgtcga; *gapdh* – agctggctcacaatgggaaa/atttgatgttaggggacg; *g6pdh* – ttatcatcatgggtgcatcg/aaggtgtcttctggtagaagg; *gusb* – ctctgtgtgcttaactgat/cagactcaggtgtgtcctcg; *thp* – cccacacagcagtcagtagc/ccacacagcagtcagtagc; RNA – tgcaggccaattccgaag/ccattgtagtgaacagtaggac and Probes: *18S* – Hs99999907\_s1; *accα* – Rn00573474\_m1; *accβ* – Rn00588290\_m1; *fasn* – Rn00569117\_m1; *gfat1* – Rn01765492\_m1; *gpat* – Rn00568620\_m1; *hmgcr* –

Rn00565598\_m1, *ldh* Rn00598442\_m1, *srebfl*  
 Rn01495769\_m1; *sreb2* Rn01502638\_m1) Life Technologies,  
 Grand Island NY; Roche, Indianapolis IN; Thermo Scientific,  
 Waltham MA).

Reactions were run on the LightCycler® 480 qPCR instrument (Roche, Indianapolis IN). Relative quantification was calculated using the  $\Delta C_q$  method corrected for amplicon efficiencies (range = 1.9–2.1). Reference gene fitness was determined by measuring a panel of genes: *18s*, *Actb*, *G6pdh*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Pgk1*, and *Tbp*. The most stable genes across the three conditions for each tissue was determined using the NormFinder algorithm [33,34]; subsequently, the GeNorm algorithm [33,34] was used to calculate the number of reference genes needed to maximize stability. For adipose tissue and liver tissue, three reference genes were utilized (*G6pdh*, *Hprt1*, *Pgk1* - variation (V) = 0.3; and *18s*, *Tbp*, *Gapdh* V = 0.1, respectively) and for heart tissue, four reference genes were used (*18s*, *G6pdh*, *Hprt1*, *Tbp* - V = 0.4).

Relative target gene expression levels were determined using the  $\Delta C_q$  method followed by reference gene normalization as described [34].

**Proteasome activity measurements.** Chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like activities of the proteasome were assayed using fluorogenic peptides (Sigma-Aldrich, St Louis, MO): Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-MCA at 25  $\mu$ M), N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LSTR-MCA at 40  $\mu$ M) and N-Cbz-Leu-Leu-Glu-b-naphthylamide (LLE-NA at 150  $\mu$ M), respectively, as described before by us [35].

**Western blotting analysis.** Total protein was extracted from tissue samples as described [36], while nuclear protein extraction was performed using the high-salt extraction method [37]. Protein concentrations for both total and nuclear lysates were determined by the Lowry method and Western blotting performed for: SREBP-1 for cytosolic (cSREBP-1) and nuclear (nSREBP-1) proteins, calmodulin, calcineurin, phosphorylated calcium/calmodulin-dependent kinase II (pCaMKII), nuclear factor of activated T-cells 3 (NFAT3), phosphorylated phospholamban (pPLB), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ), mitochondrial transcription factor A (mtTFA), nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), connexin 43 and ubiquitin. Protein detection was performed using standard methods [36] and expression determined by the adjusted percentage volume (intensity units of band  $\times$  mm<sup>2</sup>) after background subtraction and normalized to  $\beta$  actin or Ponceau stain to correct for variations in loading. Primary antibodies (rabbit or mouse) were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA) or Cell Signaling (Cell Signaling, Danvers MA) to be used at 1:1000 dilution with corresponding secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse HRP-linked antibodies at 1:4000 dilution).

**Evaluation of myocardial oxidative stress.** Superoxide dismutase (SOD) (Enzo Life Sciences, Farmingdale NY) activity was measured in mitochondrial preparations (prepared according to Boudina *et al.* [38]) following the manufacturer's instructions. The catalase activity assay is based on the properties of catalase enzyme to reduce hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) into oxygen (O<sub>2</sub>) and water (H<sub>2</sub>O) [39]. Assays were carried on about 80  $\mu$ g of protein lysate in 25 mM Tris HCl (pH 7.5). Blanks were measured at 240 nm just before adding 80  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM final) to start the reaction. Catalase activity was determined by measuring the absorbance decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm. The decomposition of hydrogen peroxide is a first order reaction type following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and the rate constant K for the overall reaction is

given by:

$$K = \frac{2.3}{\Delta t} \log \left( \frac{DO_{\infty}}{DO_t} \right)$$

Each measurement was considered with 4 replicates and data are expressed as catalytic unit (U) per mg of total protein. Protein carbonylation was performed on heart tissues as described before [40].

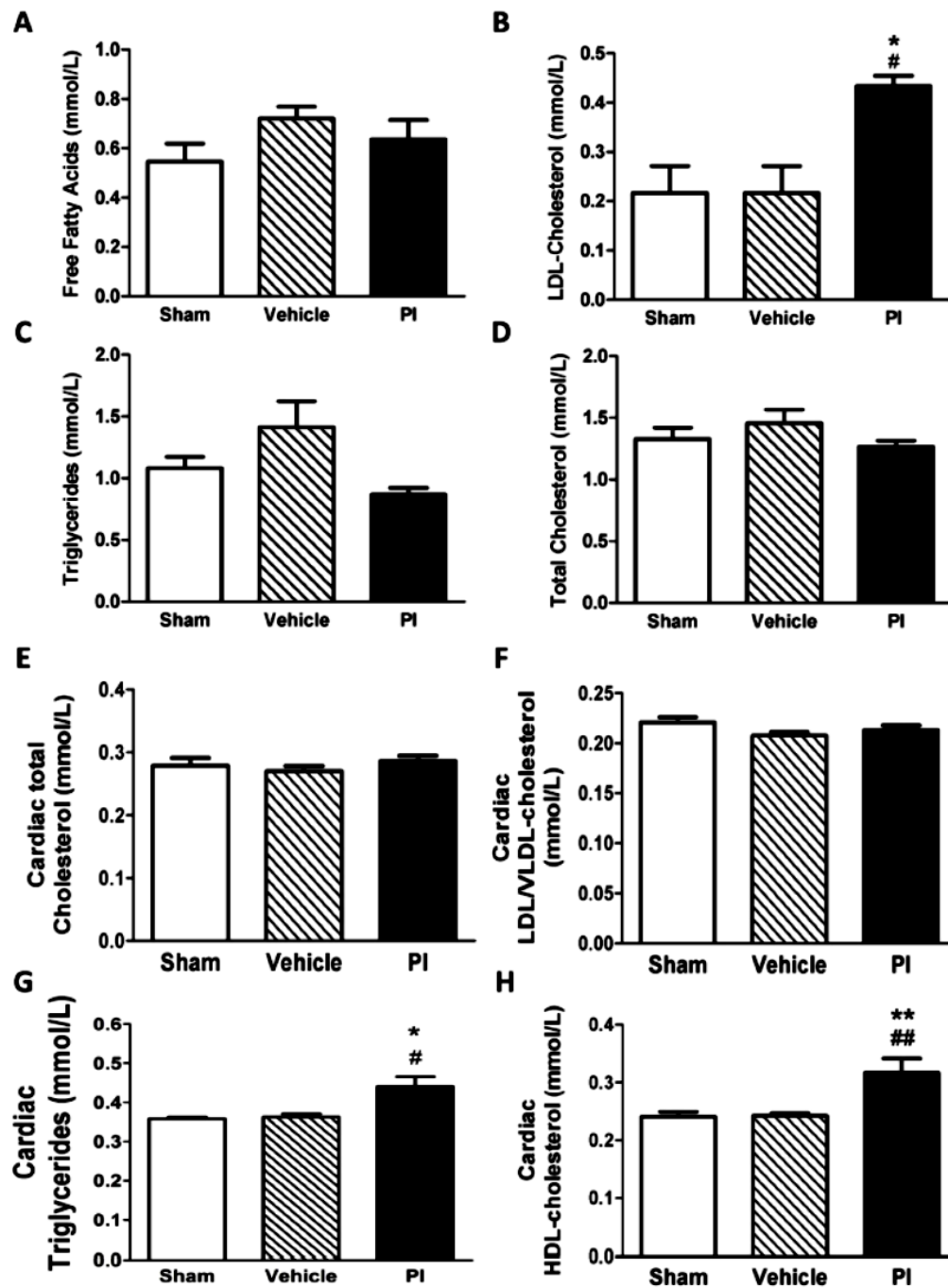
**Determination of non-oxidative pathway activation.** Briefly, collected heart tissues were homogenized with modified ice-cold RIPA buffer, the supernatant centrifuged twice at 13,000 g for 10 min at 4°C then stored at -80°C until further use. We employed Western blotting analysis to determine total O-GlcNAc expression as a marker for myocardial HBP activation, and methylglyoxal concentrations to assess AGE pathway activation (OxiSelect™ MG ELISA Kit; Cell Biolabs, San Diego CA). Methylglyoxal derivatives are formed from the non-enzymatic reaction of reducing carbohydrates such as glucose and carbonyl compounds (glyceraldehyde) in the Maillard reaction products of this reaction are called AGEs. MG levels were calculated from the standard curve and are expressed as nmol per mg protein. The PKC assay was carried out using an ELISA-based method as detailed in the kit's instruction manual (Enzo Life Sciences, Farmingdale NY). PKC activity was determined from the standard curve and expressed as ng/min/ml.

D-sorbitol, an intermediate of the polyol pathway was measured as an index of pathway activation. D-sorbitol levels were measured as detailed in the instructions of a commercially obtained kit (BioVision K 631-100, Mountain View CA). We calculated the sorbitol concentration (C) of samples by using the sample amount (nmol) from the standard curve (S<sub>s</sub>), sample volume ( $\mu$ L) used (S<sub>v</sub>) and the dilution factor (D);  $C = S_s / S_v \times D$ . We used a modified protocol (EC 2.2.1.1) from Sigma Aldrich (St. Louis MO) to determine transketolase activity as a marker of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP). Briefly, xylulose 5-phosphate and ribulose 5-phosphate are converted by transketolase in the presence of magnesium ions and thiamine pyrophosphate to glyceraldehyde 3-phosphate and sedoheptulose 7-phosphate. G 3-P is then further converted by triosephosphate isomerase to dihydroxyacetone phosphate, and with the addition of  $\beta$ -NADH and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase to produce  $\alpha$ -glycerol phosphate and  $\beta$ -NAD to be measured spectrophotometrically at 340 nm. This protocol was adapted from de la Haba *et al.* [1955] [41].

**Statistical analyses.** Data are presented as mean  $\pm$  SEM, and values considered significant when  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, with the exception of heart function (two-way ANOVA). The Bonferroni *post-hoc* test comparing all groups to each other were used to determine differences (GraphPad Prism v5, San Diego CA).

## Results

Fasting serum levels for FFA, TG, total cholesterol, insulin and glucose were not significantly altered with chronic PI treatment (Fig. 1), with HOMA-IR also not showing any differences (data not shown,  $p > 0.05$ ). However, PI treatment increased serum LDL-cholesterol levels to  $0.433 \pm 0.021$  vs.  $0.216 \pm 0.005$  mM (sham) ( $p < 0.05$ ) and vs.  $0.216 \pm 0.005$  mM (vehicle) ( $p < 0.05$ ). Furthermore, triglyceride content was significantly elevated in heart (Fig. 1G) and liver tissues (data not shown), while PI-treated hearts also exhibited higher HDL-cholesterol levels ( $p < 0.01$  vs.



**Figure 1. Serum and tissue lipid characterization (n=8).** A) serum FFA; B) serum LDL-cholesterol; C) serum TG; D) serum total cholesterol; E) cardiac total cholesterol; F) cardiac LDL-cholesterol; G) cardiac TG; and H) cardiac HDL-cholesterol. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs. sham; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test performed for statistics. FFA – free fatty acids, HDL – high density lipoprotein, LDL – low density lipoprotein, PI – protease inhibitor, TG – triglyceride.  
doi:10.1371/journal.pone.0073347.g001

sham and vehicle) (Fig. 1H). No significant elevations were found for cardiac total cholesterol and VLDL-cholesterol content ( $p>0.05$ ) (Fig. 1E, F). In addition, total food consumed in

PI-treated animals was significantly higher than the control groups; i.e.  $894\pm17.8$  g vs.  $707\pm14.3$  g (sham) ( $p<0.05$ ) and  $717\pm13.1$  g (vehicle) ( $p<0.05$ ).



Histological analysis (H & E staining) did not reveal major ultrastructural abnormalities for all tissues examined (Fig. 2A) while no fibrosis was detected (data not shown). To determine mechanisms responsible for early metabolic changes, we evaluated lipid and cholesterogenic genes in heart and liver tissues. Here PI treatment enhanced cardiac *gham* expression ( $p<0.001$  vs. sham), although this was not significant vs. vehicle-treated rats (Fig. 2B). However, hepatic *acc $\beta$*  and *hmgcr* expression were significantly upregulated in the PI group ( $p<0.05$  vs. vehicle) (Fig. 2C). Since our gene data indicate PI-mediated transcriptional effects, we next assessed the expression of the transcriptional modulator SREBP-1. However, we found no significant alterations with PI treatment for nuclear (Fig. 2D) and cytosolic SREBP1 (data not shown).

Further analyses of heart function at baseline revealed significantly decreased contractile force with PI treatment. Here both maximal and minimal contractile forces were altered with 8 weeks of PI therapy (Table 1) when compared to both sham and vehicle-treated groups. No significant differences were found between the respective control groups.

We next evaluated the effects of PI treatment on the cardiac UPS system and our data demonstrate significantly lowered chymotrypsin-like and caspase-like, but not trypsin-like proteasomal activities (Fig. 3A). In parallel, global ubiquitination of total proteins significantly increased with PI administration (Fig. 3B).

**Table 1.** Effect of PIs on *ex vivo* heart function parameters at baseline (n=8).

	Sham	Vehicle	PI
+dP/dt (mmHg/sec)	1411.0 $\pm$ 126.9	1068.8 $\pm$ 70.9	633.1 $\pm$ 57.7 *** #
−dP/dt (mmHg/sec)	−966.8 $\pm$ 71.9	−782.1 $\pm$ 118.2	−338.4 $\pm$ 31.0 *** #
Heart rate (bpm)	274.1 $\pm$ 10.6	283.5 $\pm$ 9.2	197.4 $\pm$ 36.0

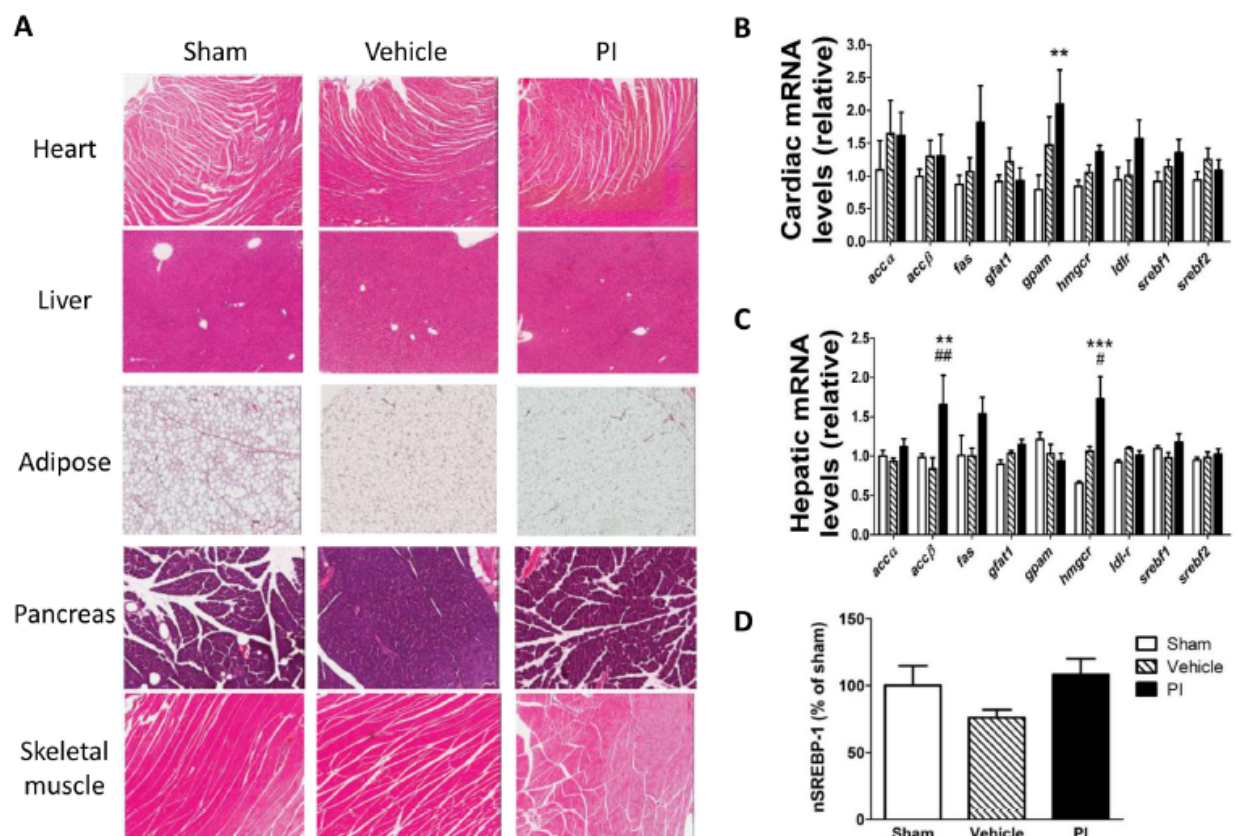
Abbreviations: PI – protease inhibitor.

\*\*\* $p<0.001$  vs. sham; # $p<0.05$  and ## $p<0.01$  vs. vehicle.

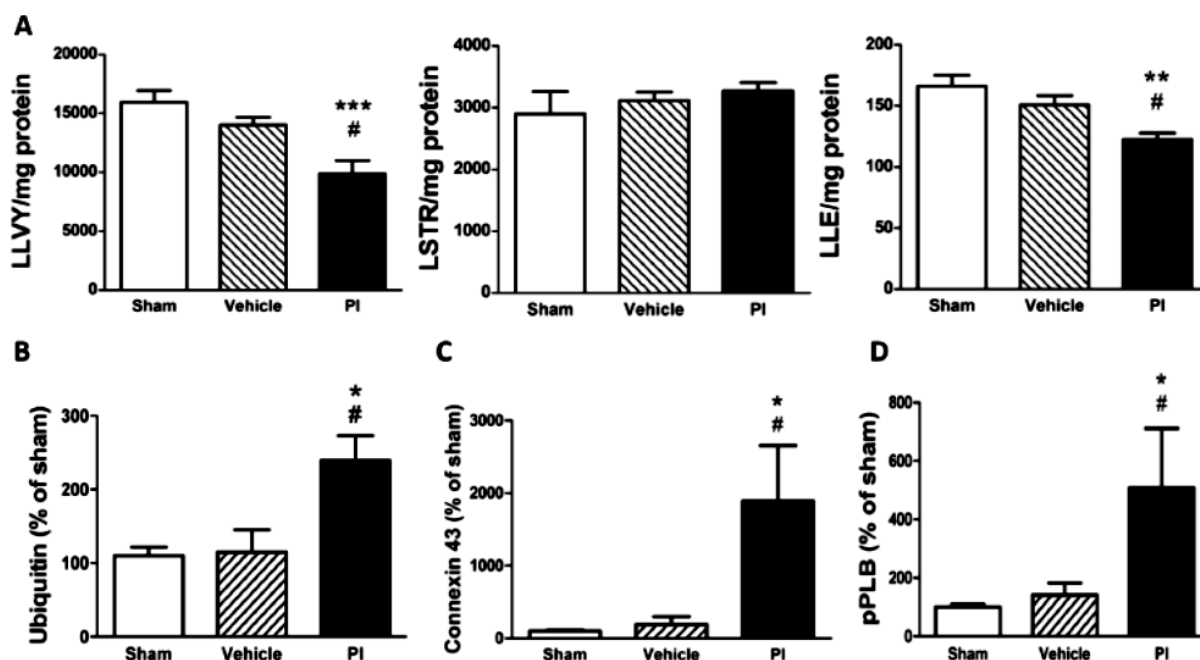
Data presented as mean  $\pm$  SEM and two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. No significant differences were found between the sham and vehicle groups, and statistical differences for PI are indicated with \* or # symbols.

doi:10.1371/journal.pone.0073347.t001

Since our earlier work pointed towards an alteration in SERCA-2a levels [17], we attempted to gain additional insight regarding PI-mediated contractile dysfunction, markers regulating this ion channel as well as a marker for electrical conductance. Here myocardial expression of the gap junction protein connexin 43 (marker for electrical conductance) and pPLB (SERCA-2a regulator) increased with PI treatment (Fig. 3C, D).



**Figure 2. Gene and histologic characterization (n=8).** A) H & E staining for various tissues following PI treatment; B) Heart; and C) liver gene regulation; and D) nuclear SREBP protein expression. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. sham; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. H & E – hematoxylin and eosin, LDL – low density lipoprotein, PI – protease inhibitor, SREBP – sterol regulatory element binding protein, gene abbreviations – refer Methods section. doi:10.1371/journal.pone.0073347.g002



**Figure 3. Proteasome and protein expression of contractile regulators following PI treatment (n = 8).** A) LLVY (chymotrypsin-like activity), LSTR (trypsin-like activity), and LLE (caspase-like activity) of the proteasome; B) Total protein ubiquitination; C) Connexin 43; and D) Phosphorylated PLB. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. sham; # $p < 0.05$  vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test performed for statistics. pPLB – phosphorylated phospholamban, PI – protease inhibitor. doi:10.1371/journal.pone.0073347.g003

We next assessed calcium and mitochondrial energetic signaling markers and found that PIs significantly downregulated the expression of the calcium-binding protein calmodulin (Fig. 4A), while calcineurin was upregulated (Fig. 4B). However, pCaMKII levels remained unchanged while nuclear NFAT3 expression increased versus controls ( $p < 0.05$  vs. sham and vehicle) (Fig. 4C, D). Here expression of PGC-1 $\alpha$  was significantly upregulated in PI-treated heart tissue (Fig. 5A) while no changes were found for mitochondrial biogenesis markers (NRF-1, mtTFA) (Fig. 5B, C).

Myocardial SOD activity within mitochondria was markedly upregulated (Fig. 6A, B) in PI-treated hearts. However, cardiac catalase activity and protein carbonylation did not differ for any of the experimental groups (Fig. 6C, D). The non-oxidative glucose pathways did not display any significant changes, except that PI treatment attenuated the AGE pathway, i.e.  $6.25 \pm 0.52$  vs.  $14.87 \pm 2.05$  nmol/mg protein (sham) ( $p < 0.01$ ) and vs.  $13.16 \pm 2.23$  nmol/mg protein (vehicle) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7).

## Discussion

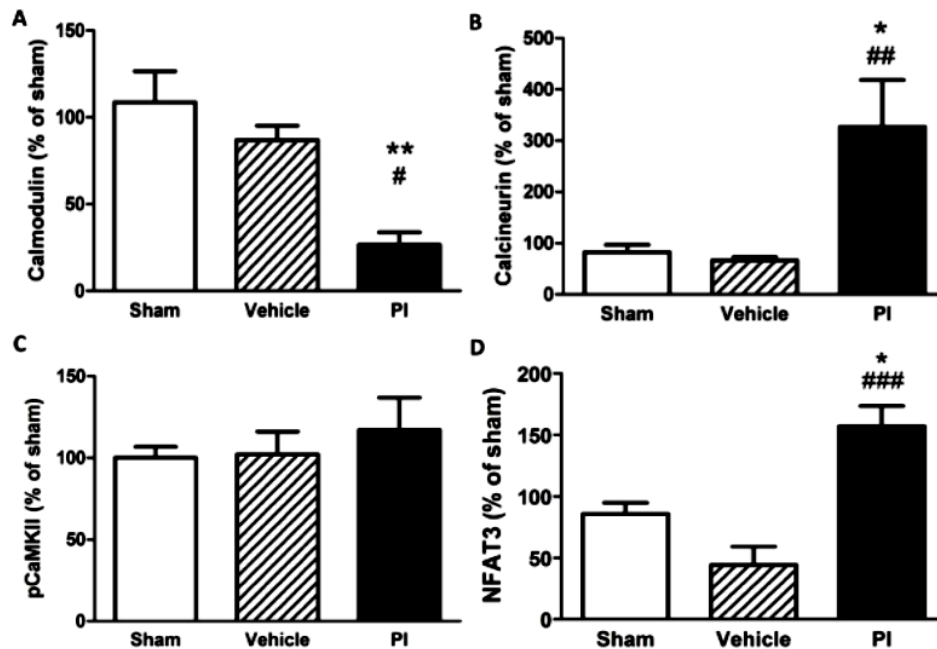
Although HAART markedly improves the quality of life and prognosis of HIV-infected individuals, it also elicits cardio-metabolic side effects in the long-term. Since molecular mechanisms underlying this process are poorly understood, we evaluated early cardio-metabolic changes in a rat model of PI treatment. The main findings of this study are: 1) PI-treated rats exhibited lipid abnormalities; and 2) Rats exposed to PIs display altered myocardial ubiquitin proteasome and calcium-handling pathways together with decreased contractile function.

**PI-treated rats exhibited lipid abnormalities.** Previous studies demonstrated that a significant proportion of HAART

patients develops impaired glucose tolerance, IR and type 2 diabetes [11,12]. Here our data revealed that PI-treated rats displayed elevated serum LDL-cholesterol and cardiac/hepatic tissue triglyceride levels, identifying perturbed lipid metabolism as a relatively early occurrence. Although not focusing on initial PI-mediated changes, previous work also reported that lipid derangements are one of the commonest side-effects triggered by Lopinavir/Ritonavir usage [42]. Moreover, clinical studies indicate that altered fat partitioning (i.e. lipodystrophy) is common with PI treatment [7,43,44] compared to overt increases in weight gain, and that this occurs within the first year of therapy. Our data indicate that the onset of IR could follow at a later stage in the progression of cardio-metabolic dysfunction following PI treatment. In support, the HOMA-IR assessment and several non-oxidative pathways of glucose metabolism (HBP, PKC, polyol pathway), that are usually strongly linked to IR and type 2 diabetes, were not activated in our model. However, the AGE pathway was unexpectedly downregulated and further studies are required to elucidate whether this is a direct effect or if it occurs as a result of other changes triggered by PI treatment.

How exactly does PI treatment induce the changes in lipid metabolism here observed? The mechanisms underlying higher food consumption with PI exposure are unclear, but well-known regulators of dietary intake (e.g. leptin, neuropeptide Y, ghrelin) may be implicated [45] and therefore form part of our ongoing investigations. PI treatment induced gene expression of *acc $\beta$*  and *hmgcr* in the liver that would be expected to enhance fatty acid oxidation and cholesterol synthesis, respectively. There were also early signs of elevated cardiac *gham* expression (although not statistically significant versus all matched controls), while it was robustly upregulated in adipose tissue (data not shown). The

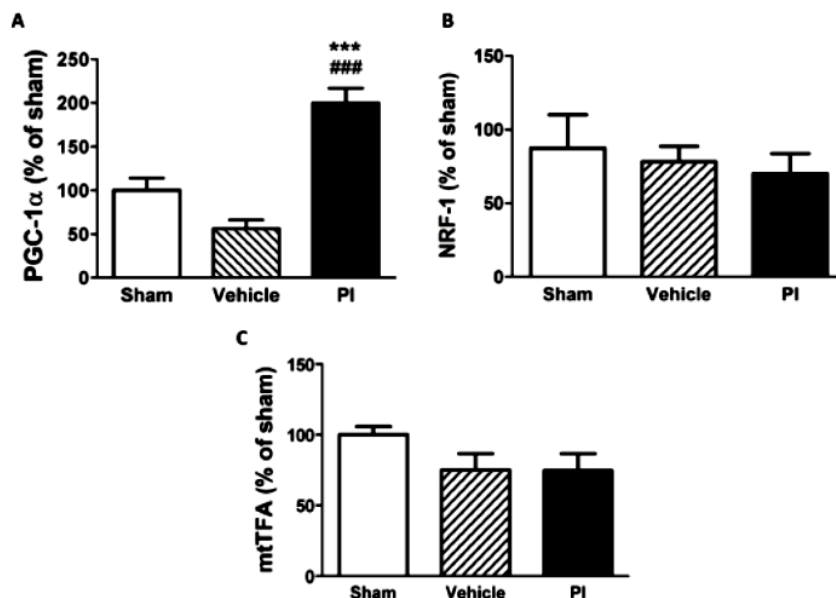




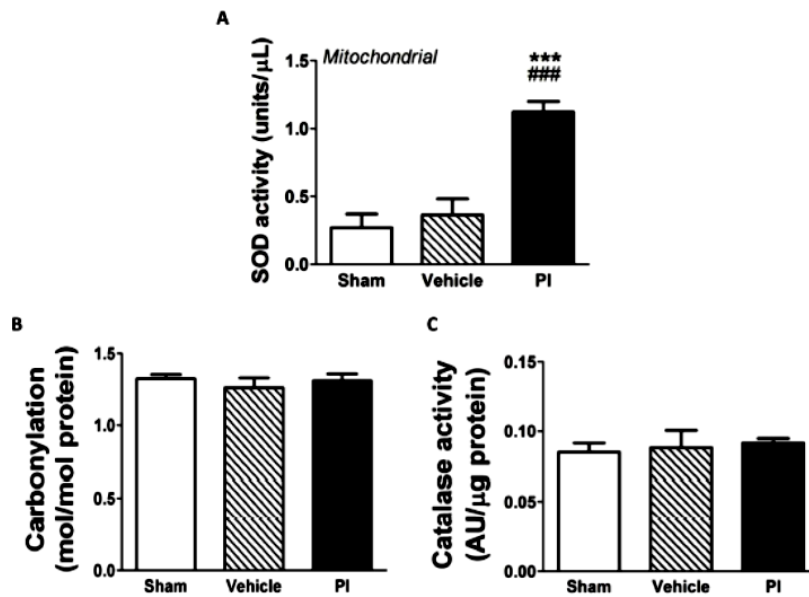
**Figure 4. Calcium pathway protein expression in response to chronic PI therapy (n=6–8).** A) Calmodulin; B) Calcineurin; C) pCaMKII; and D) NFAT3. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. sham; #p<0.05, ##p<0.01 vs. vehicle, ###p<0.001 vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. NFAT3 – nuclear factor of activated T-cells 3, pCaMKII – phosphorylated CaMKII, PI – protease inhibitor.  
doi:10.1371/journal.pone.0073347.g004

gene expression results therefore indicate that the higher serum LDL-cholesterol levels may result from greater adipose triglyceride synthesis and subsequent export to the liver and heart. Here

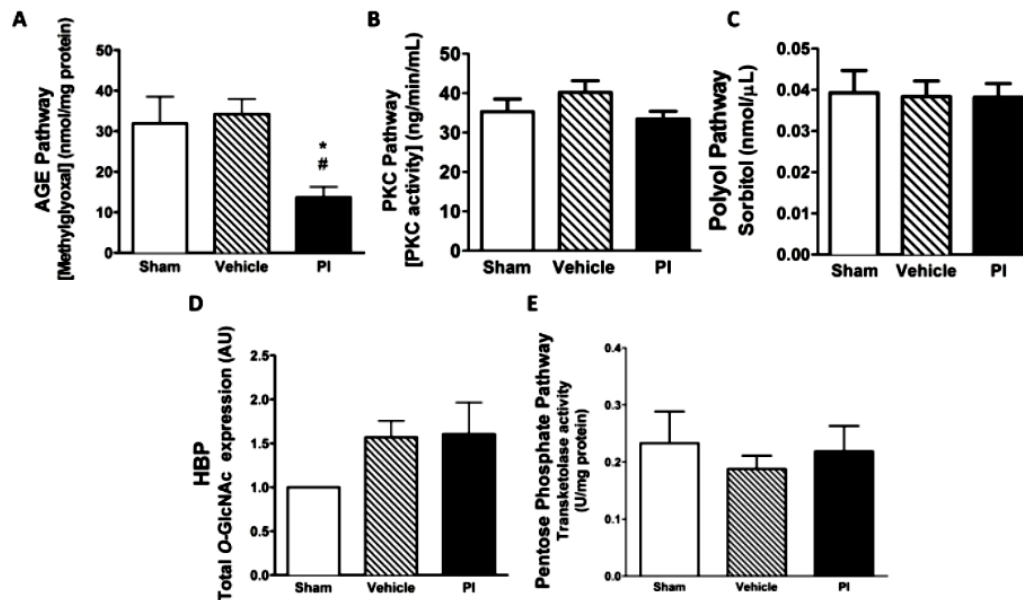
increased hepatic *hmgcr* expression may enhance VLDL production and with a corresponding elevation in the availability of circulating LDL-cholesterol.



**Figure 5. Myocardial peptide levels of transcriptional regulators of cardiac hypertrophy and mitochondrial biogenesis with 8 weeks PI therapy (n = 6–8).** A) PGC-1α; B) NRF-1; and C) mtTFA. \*\*\*p<0.001 vs. sham; ###p<0.001 vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. NRF-1 nuclear respiratory factor 1, mtTFA – mitochondrial transcription factor A, PGC-1α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha, PI – protease inhibitor.  
doi:10.1371/journal.pone.0073347.g005



**Figure 6. Myocardial oxidative stress profile (n = 8).** A) Mitochondrial SOD activity; B) Protein carbonylation; and C) Myocardial catalase activity. \*\*\*p<0.001 vs. sham; ###p<0.001 vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. PI – protease inhibitor, SOD – superoxide dismutase. doi:10.1371/journal.pone.0073347.g006



**Figure 7. Profile of cardiac non-oxidative metabolic pathways (n=8).** A) AGE; B) PKC; C) Polyol pathway (D-sorbitol); D) HBP (O-GlcNAcylation); and E) Pentose phosphate pathway (transketolase). \*p<0.05 vs. sham; #p<0.05 vs. vehicle. Data presented as mean  $\pm$  SEM and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test performed for statistics. AGE – advanced glycation end-products, HBP – hexosamine biosynthetic pathway, PI – protease inhibitor, PKC – protein kinase C. doi:10.1371/journal.pone.0073347.g007

Since PIs may also have direct transcriptional effects that trigger gene expression, we also assessed whether SREBPs—well-known transcriptional regulators of several lipid and cholesterol synthesis genes [23]—are implicated in the observed gene induction. We found no significant differences when analyzing SREBP expression (gene and protein levels) in liver and heart tissues, and suggest that other transcriptional modulators that regulate lipid and cholesterol genes may be involved. An alternate explanation may relate to the fact that Ritonavir is a reversible and competitive inhibitor of specific 20S proteasome subunits [25]. Since the UPS also plays a key role to regulate SREBP-1 binding to target gene promoters (mediating its degradation) [27,28], lower UPS activity may lead to more SREBP-1 remaining bound to gene promoter(s). This in turn could result in greater induction of target genes, even though total SREBP expression levels were unaltered. These possibilities are currently being pursued in our laboratory.

Together our study shows that early changes induced by PI treatment resemble the metabolic syndrome, a combination of risk factors that predispose to the future onset of IR, type 2 diabetes and CVD. Moreover, the higher serum LDL-cholesterol levels mirror a pre-atherogenic state that may eventually trigger the onset of various cardiac complications, e.g. acute myocardial infarction.

#### Rats exposed to PIs display altered myocardial ubiquitin proteasome and calcium-handling pathways together with decreased contractile function

What are the underlying mechanisms whereby PI administration impairs contractile function? Our results show no significant remodeling of hearts exposed to PIs, i.e. lack of ultrastructural changes, fibrosis and cardiac hypertrophic response. We also evaluated markers for myocardial oxidative stress since others found a link between PI exposure and elevated ROS production [18–20], but found no evidence of damaging effects of myocardial oxidative stress at baseline (no changes in degree of protein carbonylation). However, PI-treated hearts exhibited augmented myocardial SOD activity suggesting that increased oxidative stress is blunted by intracellular defense systems. Thus, these data indicate that harmful effects of previously reported PI-induced ROS occur at a later stage during the HAART regimen. In agreement, there was no ROS-mediated induction of several non-oxidative glucose metabolic pathways in PI-treated rats. This contrasts our recent work where greater myocardial oxidative stress, HBP activation and apoptosis contributed to contractile dysfunction [35].

The heart functional data are consistent with our earlier work [17] and reveal attenuated contractile function without significant alterations to heart rate. Here the  $\pm dP/dt$  findings implicate the myocardial calcium handling pathway, as diastolic calcium is a key determinant of contractile function and calcium signaling [46]. Since PI treatment decreased and increased myocardial UPS activity and ubiquitination, respectively, this may lead to an accumulation of contractile protein aggregates and impaired cardiac contractility and signaling pathways. For example, protein turnover of connexin 43, PLB and SERCA-2a are all regulated by the UPS [47–51] and may explain the higher expression levels found here and before by us [17]. Others have established that altered connexin 43 expression can precede arrhythmias, ventricular fibrillation and incorrect signal propagation in the long-term [52–57]. Therefore we tentatively suggest that elevated connexin 43 expression in our model may result in detrimental effects on contractile function in the future, especially within the context of HIV-AIDS.

We previously identified lower myocardial calcium levels and higher SERCA-2a protein expression with PI treatment [17], and now report attenuated and elevated calmodulin and pPLB expression levels, respectively. In parallel, we found increased myocardial calcineurin and NFAT3 expression levels. Of note, others found that cardiac-specific calcineurin overexpression resulted in enhanced pPLB and SERCA-2a expression and diminished phosphorylation and redistribution of connexin 43 [58]. This was associated with depressed contractility and cardiac hypertrophy. Here the authors proposed that connexin 43 may be a downstream target of calcineurin and that attenuated connexin 43 levels may be linked to perturbed gap junction assembly and arrhythmogenesis [58]. We propose that a similar scenario may exist in our model and that greater calcineurin activation is linked to elevated connexin 43 expression that may compromise gap junction function. Increased SERCA-2a, connexin 43 and pPLB expression may occur as a result of lower myocardial UPS and have also been implicated as downstream transcriptional targets of calcineurin [58]. Thus, elevated connexin 43 and pPLB expression may represent an adaptive response by PI-treated hearts to improve calcium handling, which may improve cardiac function. Higher calcineurin activation also leads to increased dephosphorylation and translocation of NFAT3 to the nucleus for activation of downstream targets, e.g. PGC-1 $\alpha$  and pro-hypertrophic genes [59,60]. However, since the calcineurin-NFAT3 pathway did not result in cardiac hypertrophy in our model, we are of the opinion that longer-term activation may eventually result in a hypertrophic response. These findings, however, represent a model of altered cardiac physiology and suggest a potential association with PI-induced molecular alterations to key junction and ionic proteins that may precede the onset of contractile dysfunction. Moreover, the metabolic side-effects elicited by PI treatment in our model although at a relatively early stage may also affect heart function as a downstream target. Thus we do not imply that the protein expression alterations are directly associated with the altered contractility found in our model. Data linking these phenomena are scarce and therefore makes definitive conclusions difficult. Together these findings indicate that perturbed calcium handling may contribute to the PI-mediated contractile dysfunction found in our experimental model in the longer term. However, further studies are required to confirm whether this is indeed the case.

Since myocardial PGC-1 $\alpha$  was upregulated, this implies that PIs exert initial effects at the mitochondrial level. PGC-1 $\alpha$  is a well-described transcriptional regulator of mitochondrial biogenesis [61,62] and we propose that higher expression levels may represent an early compensatory response to energetic stress. In agreement with this notion, NRF-1 and mtTFA expression remained unaltered while we previously identified no changes for myocardial ATP levels and AMPK $\alpha$  expression following 8 weeks of PI administration [17]. It is likely that reduced UPS activity in PI-treated hearts may contribute to the increased PGC-1 $\alpha$  levels here observed. In support, others established that lower UPS-mediated protein turnover in fibroblasts resulted in PGC-1 $\alpha$  stabilization and mitochondrial biogenesis [63], while it can also be rapidly degraded in the nucleus [64]. The reason(s) as to why NRF-1 and mtTFA were not upregulated in response to PGC-1 $\alpha$  remains unclear but could be a unique phenomenon within this animal model. Therefore we cautiously interpret our findings and conclude a potential association between proteasomal inhibition via PIs and activation of the PGC-1 $\alpha$  pathway.

## Study limitations

The data here generated do not allow us to make a direct causal link between metabolic/molecular alterations and decreased heart function with PI treatment. We propose that additional studies that investigate more markers of electrical conductance, ion homeostasis and mitochondrial biogenesis would be useful to help answer these questions. Further, transgenic mouse studies to generate gene knockout/knockdown of molecular targets here identified, together with PI exposure should further advance our understanding of PI-mediated cardio-metabolic complications.

In conclusion, our study demonstrates that early changes triggered by PI treatment include increased serum LDL-cholesterol and myocardial triglyceride levels, together with decreased cardiac function. Furthermore, PI exposure inhibits the myocardial UPS and leads to elevated calcineurin and connexin 43 expression that may contribute to cardiac contractile dysfunction in the long-term. Our findings also highlights potential molecular targets that may have detrimental metabolic and contractile

effects. Thus our study alerts to the association between PI treatment and cardio-metabolic side effects and we propose that further clinical studies are needed to evaluate these pathways in HIV+ patients on chronic HAART.

## Acknowledgments

This work was supported by the South African National Research Foundation and Stellenbosch University (MFE), the Conseil Régional de La Réunion and l'Europeche Jefferson (EB), and Pilot Fellowship in Academic Medicine (MSW).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KMSER MFE. Performed the experiments: KMSER TLF JCS WGO ABR CP EB PR. Analyzed the data: KMSER TLF MSW EB MFE. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSW EB MFE. Wrote the paper: KMSER MFE.

## References

- World Health Organization (2011) Global HIV/AIDS response. Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. Progress Report 2011.
- Armstrong W, Calabrese L, Tsege A (2005) HIV update. 2005: Origins, issues, Prospects, and Complications. *Clev Clin J Med* 72: 73–78.
- Melekhin VV, Shepherd BE, Simente SE, Ribeiro PF, Barkan G, et al. (2009) Antiretroviral therapy initiation before, during, or after pregnancy in HIV-1-infected women: maternal virologic, immunologic, and clinical response. *PLoS One* 4: e6961.
- Palella F (1998) Human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 338: 853–860.
- Panther LA (2002) How HIV infection and its treatment affects the cardiovascular system: what is known, what is needed. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 283: H1–H4.
- Carr A, Samaras K, Clisholm DJ, Cooper DA (1998) Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 351: 1881–1883.
- Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, et al. (1998) A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 12: F51–F58.
- Hui DY (2003) Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 42: 81–92.
- Grinspoon SK, Grunfeld C, Kotler DP, Currier JS, Lundgren JD, et al. (2008) State of the science conference: Initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS: executive summary. *Circulation* 118: 198–210.
- Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann G, Clisholm D, et al. (1999) Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 353: 2093–2099.
- Gan S, Samaras K, Thompson C, Kraegen E, Carr A, et al. (2002) Altered Myocellular and Abdominal Fat Partitioning Predict Disturbance in Insulin Action in HIV Protease Inhibitor-Related Lipodystrophy. *Diabetes* 51: 3163–3169.
- Rudich A, Ben-Romano R, Ezzion S, Bashan N (2005) Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol Scand* 183: 75–88.
- Fris-Moller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte AD, et al. (2007) Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 356: 1723–1735.
- Mundy KE, Gottlinger J, Overton ET, Henry K, Bush T, et al. (2011) High Prevalence of Echocardiographic Abnormalities among HIV-infected Persons in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 52: 378–386.
- Becker A, Silva K, Stewart S, Libhaber E, Esop A, et al. (2010) Acute Coronary Syndromes in Treatment-Naïve Black South Africans with Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Intervent Cardiol* 23: 70–77.
- Lekakis J, Tsiodras S, Kononidis I, Palios J, Poulakou G, et al. (2008) HIV-positive patients treated with protease inhibitors have vascular changes resembling those observed in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Science* 115: 189–196.
- Reyskens K, Esop M (2013) The maladaptive effects of HIV protease inhibitors (Lopinavir/Ritonavir) on the rat heart. *Int J Cardiol In press.*
- Macho A, Castedo M, Marchetti P, Aguilar JJ, Devaudin D, et al. (1995) Mitochondrial dysfunction in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood* 86: 2481–2487.
- Greenspan HC, Aronow OI (1994) Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol Today* 15: 209–213.
- Jiang B, Hebert VV, Li Y, Mathis JM, Alexander JS, et al. (2007) HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 224: 60–71.
- Matarrese P, Gambardella L, Casone A, Vella S, Cuda R, et al. (2003) Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes toward the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors. *J Immunol* 170: 6006–6015.
- Riddle TM, Kubel DG, Woodlett LA, Fichtenbaum CJ, Hui DY (2001) HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus. *J Biol Chem* 276: 37514–37519.
- Ehlerli D, Hegarty B, Bossard P, Feré P, Foulfelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839–848. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.018.
- Vallet SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF, Biol TJ, et al. (1996) A Direct Role for Sterol Regulatory Element Binding Protein in Activation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *Gene* 171: 12247–12253.
- Schmidtke G, Holzhafter H, Bogoy M, Kairies N, Groll M, et al. (1999) How an inhibitor of the HIV-1 protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem* 274: 35734–35740.
- Liang J-S, Diester O, Cooper D, Jamil H, Deckelbaum R, et al. (2001) HIV protease inhibitors protect apolipoprotein B from degradation by the proteasome: A potential mechanism for protease inhibitor-induced hyperlipidemia. *Nat Med* 7: 1327–1331.
- Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J (2006) Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding. *J Biol Chem* 281: 25278–25286.
- Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 276: 36431–36437.
- Darley-Usmar VM, Ball LF, Chatham JC (2012) Protein O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine: a novel effector of cardiomyocyte metabolism and function. *J Mol Cell Cardiol* 52: 538–549.
- Cacho J, Sevilano J, De Castro J, Herrera E, Ramos MP (2008) Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 295: E1269–E1276.
- Willis MS, Schister JC, Li L, Rodriguez JE, Hilliard EG, et al. (2009) Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. *Circ Res* 105: 80–88.
- Willis MS, He C, Li L, Wang D-Z, Gao DJ, et al. (2007) Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res* 100: 456–459.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245–5250.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1–research0034.11.

35. Mapanga R, Rajamani U, Dianini N, Zungu-Edmondson M, Kelly-Lambacher R, et al. (2012) Oleandric Acid: A Novel Cardioprotective Agent that Blunts Hyperglycemia-induced Contractile Dysfunction. *PLoS One* 7: e47322.
36. Hecker PA, Mapanga RF, Kumar CP, Ribeiro RF, Brown BH, et al. (2012) Effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the metabolic and cardiac responses to oleaginous or high-fructose diets. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 303: E959–E972.
37. Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19: 2499.
38. Boudina S, Sena S, O'Neill RJ, Tathireddy P, Young MK, et al. (2005) Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112: 2686–2695.
39. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121–126.
40. Levine R, Wells N, Williams J, Stadman E, Shacter E (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 99: 15–24.
41. Haba G De, Leder IC, Racker E (1955) Crystalline transferase from baker's yeast: isolation and properties. *J Biol Chem* 214: 409–426.
42. Walmsley S, Bernstein B, King M, Arribas J, Beall G, et al. (2002) Ritonavir versus zidovudine for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med* 346: 2039–2046.
43. Carr A, Ritzhaupt A, Zhang W, Zijdenberg R, Workman G, et al. (2008) Effects of boosted zidovudine and lopinavir on body composition, insulin sensitivity and adipocytokines in antiretroviral-naïve adults. *AIDS* 22: 2313–2321.
44. Ferrer E, Del Rio L, Martinez E, Curto J, Domingo P, et al. (2011) Impact of switching from Lopinavir/Ritonavir to Atazanavir/Ritonavir on body fat redistribution in virologically suppressed HIV-infected adults. *Aids Res Hum Retrovir* 27: 1061–1065.
45. Lagathu C, Kim M, Maachi M, Vigueroux C, Cervera P, et al. (2005) HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo. *Biochimie* 87: 65–71.
46. Louch WE, Suckale M, Spaasrud I, Christensen G, Sejersted O (2012) No rest for the weary: diastolic calcium homeostasis in the normal and failing myocardium. *Physiology* 27: 208–223.
47. VanSlyke JK, Dechenes SM, Musil LS (2000) Intracellular Transport, Assembly, and Degradation of Wild-Type and Disease-linked Mutant Gap Junction Proteins. *Mol Biol Cell* 11: 1933–1946.
48. VanSlyke JK, Musil LS (2002) Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J Cell Biol* 157: 381–394.
49. Laing JG, Beyer EC (1995) The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270: 26399–26403.
50. Laing JG, Taddei PN, Westphal EM, Beyer EC (1997) Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp Cell Res* 236: 482–492.
51. Joon HB, Choi ES, Yoon JH, Hwang JH, Chang JW, et al. (2007) A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 731–736.
52. Huang CY, Wesels A, Smith BR, Linask KK, Esanji JL, et al. (1998) Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. *Dev Biol* 198: 32–44.
53. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y (2007) Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87: 425–456.
54. Nattel S, Shirashita-Takeshita A, Brundel B, Rivard L (2005) Mechanism of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 48: 9–28.
55. Reaume A, De Sousa P, Kulkarni S, Langille B, Zhu D, et al. (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831–1834.
56. Severs N, Bruce A, Dupont E, Rothery S (2008) Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80: 9–19.
57. Ya J, Erdreich-Epstein E, De Boer P, Van Kempen M, Jongma H, et al. (1998) Heart Defects in Connexin43-Deficient Mice. *Circ Res* 82: 360–366.
58. Chu G, Carr AN, Young KB, Lester JW, Yatani A, et al. (2002) Enhanced myocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> handling in a calcineurin transgenic model of heart failure. *Cardiovasc Res* 54: 105–116.
59. Zarain-Herzberg A, Fragoso-Medina J, Estrada-Avilés R (2011) Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB life* 63: 847–855.
60. Dietrich H, Hagenmeister J, Chi M, Bockel B, Müller-Ehmsen J, et al. (2007) Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium. *J Int Med Res* 35: 803–818.
61. Puigserver P (2005) Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- $\alpha$ . *Int J Obes* 29: S5–S9.
62. Spiegelman B (2007) Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 287: 60–63.
63. Farhoud M, Nijmans L, Wanders R, Wesels H, Laxson E, et al. (2012) Impaired ubiquitin-proteasome-mediated PGC-1 $\alpha$  protein turnover and induced mitochondrial biogenesis secondary to complex-I deficiency. *Proteomics* 12: 1349–1362.
64. Trausch-Azar J, Leone TC, Kelly DP, Schwartz AL (2010) Ubiquitin proteasome-dependent degradation of the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  via the N-terminal pathway. *J Biol Chem* 285: 40192–40200.



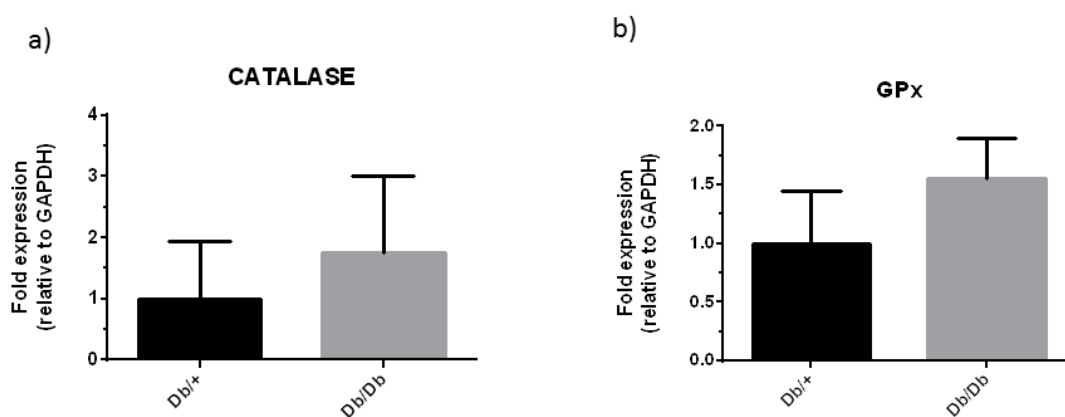


## Annexe 2 : Séquence des amorces pour qPCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
CAT	5'- CTCCTCGTTCAGGATGTGGTT-3'	5'-CGAGGGTCACGAACTGTGTCAG-3'
GPx	5'-TGCTCATTGAGAATGTCGCGTCTC-3'	5'-AGGCATTCCGCAGGAAGGTAAAGA-3'
GAPDH	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

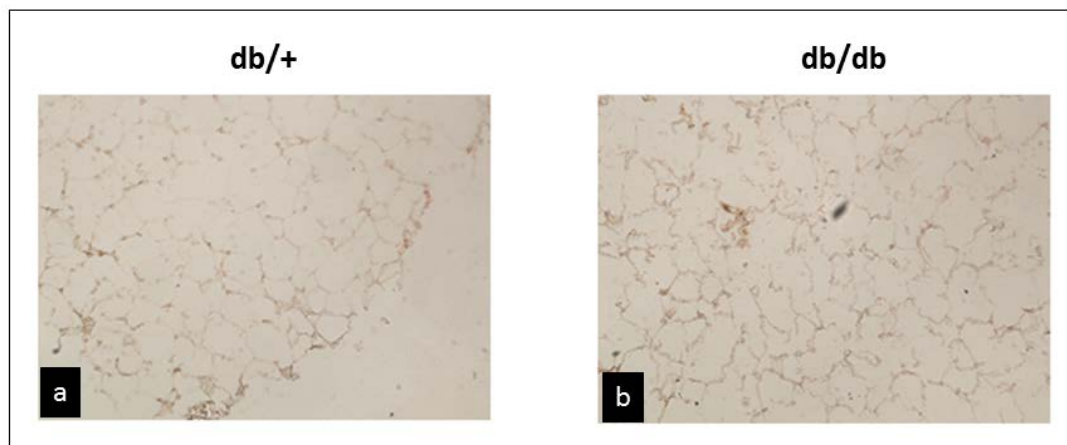
**Annexe 2. Séquence des amorces pour qPCR.** Séquence d'amorce de souris pour qPCR, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)

### Annexe 3 : Expression de gènes d'enzymes anti-oxydantes du TAE de souris db/db



**Annexe 3. Expression de gènes d'enzymes anti-oxydantes du TAE de souris db/db.**  
Expression d'ARNm : a) Catalase ; b) Gluthation peroxydase (GPx). (N=6)

#### **Annexe 4 : Expression de RAGE du TAE de souris db/db**



**Annexe 4. Expression de RAGE du TAE de souris db/db.** Expression de RAGE déterminé grâce au Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP chez les souris db/+ et les souris db/db (N=3).



## Références

1. IDF DIABETES ATLAS. 2013;Sixth edition. Available from: [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)
2. Institut de veille sanitaire (France). Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France: synthèse épidémiologique. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2010.
3. Grimaldi A. Traité de diabétologie. MÉDECINE SCIENCES FLAMMARION; 2009.
4. Usher-Smith JA, Thompson M, Ercole A, Walter FM. Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review. *Diabetologia*. 2012 Nov;55(11):2878–94.
5. DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2006 Aug;23(8):857–66.
6. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015 Jun 25;6(6):850–67.
7. Le diabète à La Réunion. *Obs Régional Santé*. 2015 Mai;
8. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1998 Jul;15(7):539–53.
9. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet Lond Engl*. 2009 May 23;373(9677):1789–97.
10. Groupe d' étude de l' OMS sur la prévention du diabète sucré (1992 : Genève, Switzerland), World Health Organization. La prévention du diabète sucré : rapport d' un groupe d' étude de l' OMS [Internet]. Genève : Organisation mondiale de la Santé; 1994. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/40118>
11. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014 Oct 28;224C:164–75.
12. Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *MS Rev* [Internet]. 2006 [cited 2015 Oct 13]; Available from: <http://ipubli-inserm.inist.fr/handle/10608/5731>
13. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875–80.
14. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A-F, Teixeira M, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev*. 2014 Apr 9;114(7):3854–918.
15. Afanas'ev I. Mechanisms of Superoxide Signaling in Epigenetic Processes: Relation to Aging and Cancer. *Aging Dis*. 2015 Jun 1;6(3):216–27.
16. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext; 2007. 1396 p.
17. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. 2014 Feb 23;2:535–62.

18. Bretón-Romero R, Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 2014 Mar 1;2:529–34.
19. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2005 Jan 17;1703(2):93–109.
20. Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes Biochim L'Actualité Chim* Novembre-Déc 2003. 2003;91–6.
21. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Feb;29(1):89–95.
22. Sanz A, Stefanatos RKA. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr Aging Sci.* 2008 Mar;1(1):10–21.
23. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999 Aug;31(4):347–66.
24. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(5):780–7.
25. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36027–31.
26. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, et al. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J.* 2004 Apr 15;379(Pt 2):359–66.
27. KOCEIR E. ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET BIOENERGETIQUES DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABETE: Rôle de la mitochondrie. [cited 2015 Oct 10]; Available from: <http://www.biologie.50webs.com/Download/Aspects%20physiopath%20et%20bioenreg%20du%20stress%20oxydant%20diabete%20KOCEIR.pdf>
28. Manucha W, Ritchie B, Ferder L. Hypertension and insulin resistance: implications of mitochondrial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2015 Jan;17(1):504.
29. Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med.* 2006;38(6):389–402.
30. Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):25078–84.
31. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008 Feb 1;31(Supplement 2):S170–80.

32. Shao B, Bayraktutan U. Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinase C- $\beta$ I and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biol.* 2014;2:694–701.
33. Thallas-Bonke V, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME. Nox-4 and progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015 Jan;24(1):74–80.
34. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res.* 2015 Nov;49(11):1308–18.
35. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart. *Circ J.* 2014;78(2):300–6.
36. Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension.* 2003 Aug;42(2):206–12.
37. Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation.* 2006 Mar 7;113(9):1235–43.
38. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2006 Dec;1763(12):1755–66.
39. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 15;33(6):774–97.
40. Lytvyn Y, Perkins BA, Cherney DZI. Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Can J Diabetes.* 2015 Jun;39(3):239–46.
41. Quan W, Jo E-K, Lee M-S. Role of pancreatic  $\beta$ -cell death and inflammation in diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2013 Sep;15 Suppl 3:141–51.
42. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 10];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4516838/>
43. Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia.* 2013 Feb;56(2):234–41.
44. Riché MD. Micronutrition, santé et performance: Comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition. De Boeck Supérieur; 2008. 386 p.
45. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1–85.



46. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000 Nov;50(4-5):279–89.
47. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1997 Jun;11(7):526–34.
48. Favier A. Le stress oxydant. *Actual Chim*. 2003;108–15.
49. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959 May;82(1):70–7.
50. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346–57.
51. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2000;99:15–24.
52. Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Anal Biochem*. 2012 Apr 15;423(2):241–5.
53. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P. Le stress oxydant. *Rev Médicale Liège [Internet]*. 2007 [cited 2015 Sep 25];62(10). Available from: <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/8914>
54. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*. 2006 Sep;47(9):1975–83.
55. Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides*. 2006 Jan;13(1):24–9.
56. Anderson EJ, Katunga LA, Willis MS. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Feb;39(2):179–93.
57. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(6):515–40.
58. Garcia YJ, Rodríguez-Malaver AJ, Peñaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods*. 2005 May 15;144(1):127–35.
59. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
60. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes--second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47 Suppl 1:39–48.

61. Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol*. 2009 Oct;44(10):625–33.
62. Tanito M, Elliott MH, Kotake Y, Anderson RE. Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Oct;46(10):3859–68.
63. Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol*. 2013;1:145–52.
64. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem* [Internet]. 2015 Jun 2 [cited 2015 Oct 14];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451417/>
65. Pflaum M, Epe B. Measuring oxidative DNA damage by alkaline elution, in *Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Course*. In eds. Lunec J., Griffiths H. R., editors. (Chichester: John Wiley & Sons, LTD;); 2000. p. 95–104.
66. Ohshima H, Virág L, Souza J, Yermilov V, Pignatelli B, Masuda M, et al. Detection of Certain Peroxynitrite-Induced DNA Modifications. In: Armstrong D, editor. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols* [Internet]. Humana Press; 2002 [cited 2016 Mar 4]. p. 77–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-173-6%3A77>
67. Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J*. 1998 May 15;332 ( Pt 1):251–5.
68. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1999 Mar 15;4:D339–45.
69. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol*. 2013 Dec 11;2:170–7.
70. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem*. 2002 Nov;35(8):627–31.
71. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2011 May 13;12(5):3117–32.
72. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995 Dec;11(4):376–81.
73. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9782–7.

74. Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 Jan;56(1):1–7.
75. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res.* 1986 Jul 11;14(13):5321–35.
76. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* 1970 Jul;50(3):319–75.
77. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha).* 2014;60(4):153–67.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. In: *Free radicals in biology and medicine* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
79. Abou-Seif MA, Youssef A-A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2004 Aug 16;346(2):161–70.
80. Ramakrishna V, Jaikhani R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol.* 2008 Mar;45(1):41–6.
81. Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free Radic Biol Med.* 2003 Jul 15;35(2):133–9.
82. Gil-del Valle L, de la C Milian L, Toledo A, Vilaró N, Tápanes R, Otero MA. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res.* 2005 Apr;51(4):375–80.
83. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(7):1097–110.
84. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res.* 2005 Jul;39(7):671–86.
85. Tabatabaei-Malazy O, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. Influence of Ascorbic Acid Supplementation on Type 2 Diabetes Mellitus in Observational and Randomized Controlled Trials; A Systematic Review with Meta-Analysis. *J Pharm Pharm Sci.* 2015 Jan 1;17(4):554–82.
86. Steffner RJ, Wu L, Powers AC, May JM. Ascorbic acid recycling by cultured beta cells: effects of increased glucose metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2004 Nov 15;37(10):1612–21.
87. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1997 Jun;27(6):484–90.
88. Odum EP, Ejilemele AA, Wakwe VC. Antioxidant status of type 2 diabetic patients in Port Harcourt, Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 2012 Mar;15(1):55–8.

89. Chambi S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian J Clin Biochem.* 2013 Oct;28(4):314–28.
90. Knekt P, Reunanen A, Marniemi J, Leino A, Aromaa A. Low vitamin E status is a potential risk factor for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med.* 1999 Jan;245(1):99–102.
91. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest.* 1998 Apr;28(4):329–33.
92. Laight DW, Carrier MJ, Änggård EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):457–64.
93. Gaziano JM. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999 Feb;111(1):2–9.
94. Jain SK, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T, Meachum ZD, et al. The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetic patients. *Lipids.* 1996 Mar;31 Suppl:S87–90.
95. Maxwell SR. Antioxidant vitamin supplements: update of their potential benefits and possible risks. *Drug Saf.* 1999 Oct;21(4):253–66.
96. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Sep;16(9):1137–54.
97. Sadowska-Bartoszyńska I, Galiniak S, Bartoszyński G. Polyphenols protect against protein glycoxidation. *Free Radic Biol Med.* 2014 Oct;75 Suppl 1:S47.
98. Jung KH, Choi HS, Kim DH, Han MY, Chang UJ, Yim S-V, et al. Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. *J Med Food.* 2008 Sep;11(3):429–34.
99. Munir KM, Chandrasekaran S, Gao F, Quon MJ. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Sep 15;305(6):E679–86.
100. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2002 Nov;83(1-2):109–16.
101. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu J-B, Sasaoka T, Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol.* 2004 Aug 26;4:18.
102. Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol.* 2010 Dec;2(6):308–17.

103. Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 2001 Apr;83(3-4):301–10.
104. Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome System: Death of Proteins is Required for Life of Cells. *Cell Transm Newsl*. 2003;19(3):3–9.
105. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):349–60.
106. Pacifici RE, Salo DC, Davies KJ. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radic Biol Med*. 1989;7(5):521–36.
107. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):373–428.
108. Muñoz C, San Francisco J, Gutiérrez B, González J. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. *BioMed Res Int [Internet]*. 2015 [cited 2015 Sep 30];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452248/>
109. Shang F, Nowell TR, Taylor A. Removal of oxidatively damaged proteins from lens cells by the ubiquitin-proteasome pathway. *Exp Eye Res*. 2001 Aug;73(2):229–38.
110. Reinheckel T, Ullrich O, Sitte N, Grune T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000 May 1;377(1):65–8.
111. Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J*. 1998 Nov 1;335 ( Pt 3):637–42.
112. Romanucci M, Della Salda L. Oxidative Stress and Protein Quality Control Systems in the Aged Canine Brain as a Model for Human Neurodegenerative Disorders. *Oxid Med Cell Longev [Internet]*. 2015 [cited 2015 Oct 19];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442305/>
113. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem*. 2001 Aug 10;276(32):30057–63.
114. Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):23787–93.
115. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999 Jan;13(1):23–30.

116. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615–25.
117. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. 1994 Jan;43(1):1–8.
118. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):859–66.
119. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2013;2013:1–13.
120. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):855–64.
121. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1058–70.
122. Xia L, Wang H, Goldberg HJ, Munk S, Fantus IG, Whiteside CI. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Feb;290(2):F345–56.
123. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha S, Suzuma K, Way KJ, et al. Activation of vascular protein kinase C- $\beta$  inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(3):691–8.
124. Yan L-J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res*. 2014;2014:1–11.
125. Daniels MC, Ciaraldi TP, Nikoulina S, Henry RR, McClain DA. Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in cultured human skeletal muscle cells: relationship to glucose disposal rate in control and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects and regulation by glucose and insulin. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1235–41.
126. Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, McClain DA. Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes*. 2000 Sep;49(9):1492–9.
127. Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*. 2013 Aug;10(4):365–80.
128. Semba RD, Huang H, Luttly GA, Van Eyk JE, Hart GW. The Role of O-GlcNAc Signaling in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Proteomics Clin Appl*. 2014 Apr;8(0):218–31.
129. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2000 Sep;77:S13–8.

130. Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL. Les produits de glycation avancée (AGE): de nouvelles toxines? *Néphrologie*. 2002;23(7):349–57.
131. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):238–43.
132. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6474–9.
133. Maessen DEM, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2015 Jun;128(12):839–61.
134. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006 Apr;366(1-2):190–5.
135. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007 Dec;9(12):1146–55.
136. Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:534873.
137. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411–29.
138. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 1992 Jul 25;267(21):14987–97.
139. Pollreisz A, Hudson BI, Chang JS, Qu W, Cheng B, Papapanou PN, et al. Receptor for advanced glycation endproducts mediates pro-atherogenic responses to periodontal infection in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2010 Oct;212(2):451–6.
140. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013 Jul 1;94(1):55–68.
141. Gillery P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. *J Société Biol*. 2001;195(4):387–90.
142. Grimm S, Ott C, Hörlacher M, Weber D, Höhn A, Grune T. Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. *Biochem J*. 2012 Nov 15;448(1):127–39.

143. Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 25;109(39):15888–93.
144. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med Berl Ger*. 2005 Nov;83(11):876–86.
145. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Sep;7(9):526–39.
146. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11767–72.
147. Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 12;103(37):13801–6.
148. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jan;294(1):C145–52.
149. Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM, et al. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 1;88(11):4931–5.
150. Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1333–9.
151. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett*. 2003 Feb 27;537(1-3):85–90.
152. Horiuchi S, Unno Y, Usui H, Shikata K, Takaki K, Koito W, et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:671–5.
153. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Joseph KS, Wa C, DeBolt E, et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2013 Oct 21;0:64–76.
154. Roohk HV, Zaidi AR. A Review of Glycated Albumin as an Intermediate Glycation Index for Controlling Diabetes. *J Diabetes Sci Technol Online*. 2008 Nov;2(6):1114–21.



155. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
156. Halliwell B. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol.* 1988 Feb 15;37(4):569–71.
157. Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Jan 30;869(2):119–27.
158. Baraka-Vidot J, Planesse C, Meilhac O, Militello V, van den Elsen J, Bourdon E, et al. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. *Biochemistry (Mosc).* 2015 May 19;54(19):3051–62.
159. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 May;76(2):236–44.
160. Unoki H, Yamagishi S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Des.* 2008;14(10):987–9.
161. Nihar Ranjan Singh PR. Identification of Up-Regulated Low Molecular Weight Proteins in Human Adipocytes Treated with Glycoxidized Albumin. *Open Obes J.* 2010;2:110–5.
162. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol Off J Korean Physiol Soc Korean Soc Pharmacol.* 2014 Feb;18(1):1–14.
163. Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord.* 2014 Apr 7;13:49.
164. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc.* 2000 Oct;100(10):621–34.
165. Jeffcoate SL. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2004 Jul;21(7):657–65.
166. Kosecki SM, Rodgers PT, Adams MB. Glycemic monitoring in diabetics with sickle cell plus beta-thalassemia hemoglobinopathy. *Ann Pharmacother.* 2005 Sep;39(9):1557–60.
167. Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J.* 2010;57(9):751–62.
168. Hashimoto K, Osugi T, Noguchi S, Morimoto Y, Wasada K, Imai S, et al. A1C but not serum glycated albumin is elevated because of iron deficiency in late pregnancy in diabetic women. *Diabetes Care.* 2010 Mar;33(3):509–11.

169. Cohen MP. Perspective: measurement of circulating glycated proteins to monitor intermediate-term changes in glycaemic control. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc.* 1992 Dec;30(12):851–9.
170. Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin Chem.* 1987 Dec;33(12):2153–63.
171. Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun;1830(6):3532–41.
172. Syrový I. Glycation of albumin: reaction with glucose, fructose, galactose, ribose or glyceraldehyde measured using four methods. *J Biochem Biophys Methods.* 1994 Mar;28(2):115–21.
173. Amornrit W, Santiyanont R. Effect of Amaranthus on Advanced Glycation End-Products Induced Cytotoxicity and Proinflammatory Cytokine Gene Expression in SH-SY5Y Cells. *Molecules.* 2015 Sep 18;20(9):17288–308.
174. Serban AI, Stanca L, Geicu OI, Dinischiotu A. AGEs-Induced IL-6 Synthesis Precedes RAGE Up-Regulation in HEK 293 Cells: An Alternative Inflammatory Mechanism? *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 25;16(9):20100–17.
175. Wang B, P. CC, Pippin JJ. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2014 Mar;10(2):131–45.
176. Coleman DL, Hummel KP. Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice. *Diabetologia.* 1974 Nov;10(1):607–10.
177. Belke D, Severson D. Diabetes in Mice with Monogenic Obesity: The db/db Mouse and Its Use in the Study of Cardiac Consequences. In: Joost H-G, Al-Hasani H, Schürmann A, editors. *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Humana Press; 2012 [cited 2015 Oct 18]. p. 47–57. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7_4)
178. Allen TJ, Cooper ME, Lan HY. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy. *Curr Atheroscler Rep.* 2004 May;6(3):197–202.
179. Han KL, Choi JS, Lee JY, Song J, Joe MK, Jung MH, et al. Therapeutic potential of peroxisome proliferators--activated receptor-alpha/gamma dual agonist with alleviation of endoplasmic reticulum stress for the treatment of diabetes. *Diabetes.* 2008 Mar;57(3):737–45.
180. Jafar-Mohammadi B, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes mellitus and obesity--a review. *Ann Med.* 2008;40(1):2–10.
181. Berglund O, Frankel BJ, Hellman B. Development of the insulin secretory defect in genetically diabetic (db/db) mouse. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1978 Mar;87(3):543–51.

182. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):727–35.
183. Solano MP, Goldberg RB. Lipid Management in Type 2 Diabetes. *Clin Diabetes*. 2006 Jan 1;24(1):27–32.
184. Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases*. CRC Press; 1997. 586 p.
185. OMS | Obésité [Internet]. WHO. [cited 2015 Oct 24]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/fr/>
186. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 26;16(1):378–400.
187. Freedman DS, Wang J, Thornton JC, Mei Z, Sopher AB, Pierson RN, et al. Classification of body fatness by body mass index-for-age categories among children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Sep;163(9):805–11.
188. Sikaris KA. The clinical biochemistry of obesity. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem*. 2004 Aug;25(3):165–81.
189. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med*. 2009 Nov;121(6):21–33.
190. Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH, et al. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obes Silver Spring Md*. 2008 Jun;16(6):1161–77.
191. Kelishadi R. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiol Rev*. 2007;29:62–76.
192. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 23];2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468292/>
193. Démarchez M. Biologie de la peau [Internet]. <http://biologiedelapeau.fr>. 2015 [cited 2015 Oct 23]. Available from: <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article28>
194. Tarnus E, Bourdon E. Anthropometric evaluations of body composition of undergraduate students at the University of La Réunion. *Adv Physiol Educ*. 2006 Dec 1;30(4):248–53.
195. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol*. 2006 Aug;329(8):570–7; discussion 653–5.
196. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obes Silver Spring Md*. 2006 Aug;14 Suppl 5:242S – 249S.

197. Scherer PE. Adipose Tissue From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*. 2006 Jun 1;55(6):1537–45.
198. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004 Sep;30(4):294–309.
199. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol*. 2006 Aug;329(8):598–607; discussion 653–5.
200. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793–801.
201. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1;51(7):1289–301.
202. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec;25(3-4):283–92.
203. Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, Nagai R, Carson JA, Thorpe SR, et al. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes: succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. *J Biol Chem*. 2009 Sep 18;284(38):25772–81.
204. Singh NR, Rondeau P, Hoareau L, Bourdon E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res*. 2007 Oct;41(10):1078–88.
205. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. 2015 Oct 10;6(13):1246–58.
206. Matheus AS de M, Tannus LRM, Cobas RA, Palma CCS, Negrato CA, Gomes M de B. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens*. 2013;2013:653789.
207. Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Wainstein MV, Boff W, Puñales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes*. 2015 Jun 10;6(5):679–92.
208. Makita T, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Numano F. Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein (LDL) uptake into macrophages in patients with diabetes mellitus. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 1999 Jun;18(2):149–53.
209. Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):1038–45.
210. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015;58(5):886–99.

211. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;947:199–205; discussion 205–6.
212. Rosenstock J, Challis P, Strowig S, Raskin P. Improved diabetes control reduces skeletal muscle capillary basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1988 Feb 19;4(3):167–75.
213. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):15918–53.
214. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta.* 1983 Jan 7;127(1):87–95.
215. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248–54.
216. Abid MR, Spokes KC, Shih S-C, Aird WC. NADPH Oxidase Activity Selectively Modulates Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):35373–85.
217. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156–9.
218. Koeck T, Willard B, Crabb JW, Kinter M, Stuehr DJ, Aulak KS. Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2009 Apr 1;46(7):884–92.
219. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez MV. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest Anim Endocrinol.* 2016 Jan;54:76–84.
220. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Jun 23;13:103.
221. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol.* 2014 Sep 1;222(3):R113–27.
222. Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Sep 1;23(7):597–612.
223. Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Investig Med Médecine Clin Exp.* 1995 Aug;18(4):275–81.
224. Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2010 Feb 19;106(3):463–78.

225. Divald A, Powell SR. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 1;40(1):156–64.
226. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635–43.
227. Youn J-Y, Siu KL, Lob HE, Itani H, Harrison DG, Cai H. Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes*. 2014 Jul;63(7):2344–55.
228. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752–61.
229. Yamagishi S-I, Nakamura N, Suematsu M, Kaseda K, Matsui T. Advanced Glycation End Products: A Molecular Target for Vascular Complications in Diabetes. *Mol Med Camb Mass*. 2015;21 Suppl 1:S32–40.
230. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194–222.
231. Wu C-H, Huang H-W, Huang S-M, Lin J-A, Yeh C-T, Yen G-C. AGE-induced interference of glucose uptake and transport as a possible cause of insulin resistance in adipocytes. *J Agric Food Chem*. 2011 Jul 27;59(14):7978–84.
232. Koektuerk B, Aksoy M, Horlitz M, Bozdog-Turan I, Turan RG. Role of diabetes in heart rhythm disorders. *World J Diabetes*. 2016 Feb 10;7(3):45–9.
233. Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, Haskó G, Ferdinandy P, Pacher P. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1852(2):232–42.
234. Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Sep;31(9):1653–62.
235. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
236. Bourdon E, Blache D. The Importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(2):293–311.
237. Francis GL. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*. 2010 Jan;62(1):1–16.
238. Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Sep;31(9):1653–62.
239. Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H153–73.

240. Luoma P V, Näyhä S, Sikkilä K, Hassi J. High serum alpha-tocopherol, albumin, selenium and cholesterol, and low mortality from coronary heart disease in northern Finland. *J Intern Med*. 1995 Jan;237(1):49–54.
241. Phillips A, Gerald Shaper A, Whincup P. ASSOCIATION BETWEEN SERUM ALBUMIN AND MORTALITY FROM CARDIOVASCULAR DISEASE, CANCER, AND OTHER CAUSES. *The Lancet*. Elsevier; 1989 Dec 16;334(8677):1434–6.
242. Mapanga RF, Joseph D, Symington B, Garson K-L, Kimar C, Kelly-Laubscher R, et al. Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2014;210:546–64.
243. Mapanga R, Rajamani U, Dlamini N, Zungu-Edmondson M, Kelly-Laubscher R, Shafiullah M, et al. Oleanolic Acid: A Novel Cardioprotective Agent that Blunts Hyperglycemia-induced Contractile Dysfunction. *PLoS One*. 2012;7(10):e47322.
244. Pye J, Ardeshipour F, McCain A, Bellinger D a, Merricks E, Adams J, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Mar;284(3):H919–26.
245. Adams B, Mapanga RF, Essop MF. Partial inhibition of the ubiquitin-proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion in the presence of high glucose. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:94.
246. Robinet A, Alouane L, Hoizey G, Millart H. Advanced-glycation end products (AGEs) derived from glycated albumin suppress early beta1-adrenergic preconditioning. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Feb;21(1):35–43.
247. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie*. 2011 Apr;93(4):645–58.







# Stress oxydant et pathologie diabétique

## Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses

### Résumé

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre les défenses antioxydantes et les espèces pro-oxydantes en faveur de ces derniers. Il joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires.

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique, source d'un stress oxydant accru et de dommages oxydatifs tissulaires. Notamment l'hyperglycémie favorise la glycation des protéines aboutissant à la formation de produits avancés de glycation (AGE). Bien que l'action délétère des AGE soit reconnue dans le diabète, leurs rôles au niveau cardiaque et adipeux restent encore assez méconnus.

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer les effets du stress oxydant, induit par l'hyperglycémie et l'albumine glyquée, au niveau des tissus adipeux et cardiaque, mais aussi au niveau de lignées cellulaires adipocytaires et cardiaques.

Mes résultats ont montré un impact délétère de l'hyperglycémie tant au niveau cellulaire que tissulaire. De plus, certains dysfonctionnements identifiés au niveau de cœurs ou de tissu adipeux provenant de modèle animaux diabétiques ont pu être reproduits *in vitro* par l'incubation de lignées cellulaires adipeuses ou cardiaques en présence d'albumine glyquée.

Cette étude propose de nouveaux éléments de compréhension sur les dommages de type oxydatif dans le cadre de la pathologie diabétique et ouvre de nouvelle piste d'étude sur le rôle spécifique que pourrait exercer les AGE issus de l'albumine au niveau du tissu adipeux et cardiaque.

**Mots clés :** Stress oxydant, diabète, albumine glyquée, tissu adipeux, cœur

### Abstract

Oxidative stress is defined as "an imbalance between oxidants and anti-oxidants in favor of the oxidants", leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage. It plays a central role in many diseases such as obesity, diabetes and cardiovascular diseases.

Diabetes is characterized by chronic hyperglycemia, a source of increased oxidative stress and tissue oxidative damage. In particular, hyperglycemia can promote protein glycation leading to the formation of advanced glycation end products (AGEs). Although the deleterious action of AGEs in diabetes is recognized, its impact in the heart and adipose tissues remains relatively unknown.

The objective of this thesis was therefore to determine the effects of hyperglycemia-induced oxidative stress together with glycated albumin on the redox balance of adipose and cardiac tissues, and also by *in vitro* analysis of heart and adipocyte cell lines.

This study revealed enhanced oxidative stress and damage induced by hyperglycemia at both cellular and tissue levels. In addition, the oxidative damage identified in heart and adipose tissues isolated from diabetic mice could be reproduced *in vitro* by the incubation of adipose or cardiac cell lines in the presence of glycated albumin.

The current study proposes novel insights into redox imbalance in adipose and heart tissues of diabetic/obese mice and highlights the role of AGEs (especially glycated albumin) as a putative contributor to adipocyte and cardiomyocyte dysfunction.

**Key words:** oxidative stress, diabetes, glycated albumin, adipose tissue, heart

## LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Boyer Florence.....  
en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Denis....., le (date) 30/03/2016.....

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

### Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

#### La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.